

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**ENDOCARDITIS CRONICA SOBRE VÁLVULA  
PROTÉSICA POR *PROPIONIBACTERIUM ACNES*:  
DE SUS MANIFESTACIONES CLÍNICAS A SUS  
CARACTERÍSTICAS FISIOPATOLÓGICAS**

TESIS DOCTORAL

AUTORA: LAURA GUÍO CARRIÓN

DIRECTORA: CRISTINA SARRIÁ CEPEDA

Madrid, 2010



## **AGRADECIMIENTOS**

*A la Dra. Cristina Sarriá Cepeda, a quien le debo el haberme embarcado en el mundo de la investigación, por la oportunidad que me ha brindado por poder desarrollar esta tesis doctoral, por toda la sabiduría, la búsqueda de la perfección, la ética científica y el afán de superación que siempre me ha transmitido. Por sus desvelos. Por su tiempo. Pero sobre todo porque después de estos años queda una profunda amistad, a pesar de la distancia. Gracias de corazón.*

*A la Dra. M<sup>a</sup> Carmen de las Cuevas, por su ayuda en el laboratorio de Microbiología, su incondicionalidad y sus enseñanzas. A la Dra. Teresa Alarcón, por su paciencia al transmitir conocimientos y por su tesón. Al resto de médicos del servicio de Microbiología del Hospital de La Princesa, por su constante apoyo.*

*Al Dr. Gamallo, por su entusiasmo, su dedicación, su entrega, y su cariño.*

*Al Dr. Juan Duarte, por ser ejemplo del trabajo bien hecho. Al Dr. Nuche, por su colaboración con el proyecto.*

*Al Dr. Francisco Sánchez Madrid, y a todo el personal del Laboratorio de Inmunología, especialmente e a Mónica Sala-Valdés, por toda la ayuda prestada en la consecución de los experimentos.*

*Al resto de compañeros que han colaborado a lo largo de estos años con el Grupo de Estudio de Endocarditis, entre ellos a los Drs. Diego A. Rodríguez y Juan Víctor Sanmartín. Quiero agradecer de forma especial al Dr. Alberto Domínguez, fue él quien me animó a entrar en el Grupo, vaya mi cariño allí donde esté.*

*A la Dra. Fariñas, el Dr. Velayos, el Dr. Pintado, y el Dr. Cereizo, por habernos permitido analizar datos de sus pacientes.*

*A la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario de La Princesa, por la concesión de una beca a éste trabajo.*

*A mis padres, porque siempre han creído en mí, y gracias a ese apoyo me he convertido en la persona que soy. A mi hermana María, por toda la ayuda prestada en temas informáticos.*

*A mis hijos Pablo, Irene y Daniel, sois lo mejor de mi vida y mi más preciado tesoro.*

*Y por supuesto a Eduardo, mi amor, mi aliento.*



# INDICE

---

<b>1. <u>INTRODUCCIÓN Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA</u></b>	<b>6</b>
1.1. INTRODUCCIÓN	7
1.2. <i>PROPIONIBACTERIUM</i> ACNES	
1.2.1. GENERALIDADES	8
1.2.2. VIRULENCIA Y PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS	10
1.2.3. <i>PROPIONIBACTERIUM</i> ACNES TIPO I Y II	12
1.2.4. LA ENDOCARDITIS POR <i>PA</i> EN LA LITERATURA	15
A. DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS PUBLICADOS DE EIVPPA	20
B. DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS PUBLICADOS DE EI NATIVA POR <i>PA</i>	23
1.3. NUEVOS CONCEPTOS EN LA PATOGENESIS DE LA ENDOCARDITIS PROTÉSICA	
1.3.1. LA BIOCAPA	26
1.3.1.1. GENERALIDADES	26
1.3.1.2. LA BIOCAPA DEL P. ACNES	32
1.3.1.3. VISUALIZACIÓN DE LA BIOCAPA	34
1.3.2. LA ANGIOGÉNESIS Y LOS POLIMORFISMOS DEL VEGF	37
1.3.3. LA METALOSIS	39
1.4. PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENDOCARDITIS NO BASADOS EN CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS	41
1.4.1. LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA ENDOCARDITIS: DIAGNÓSTICO POR PCR	42
1.4.2. LA INMUNOLOGÍA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN: INMUNOFLUORESCENCIA Y ANTICUERPOS MONOCLONALES (ACMO)	44

<b>2. <u>HIPÓTESIS</u></b> .....	46
<b>3. <u>OBJETIVOS</u></b> .....	48
<b>4. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b> .....	50
<b>4.1. <u>INVESTIGACIÓN CLÍNICA</u></b>	
4.1.1. DEFINICIONES .....	51
4.1.2. PACIENTES.....	51
4.1.3. DATOS .....	52
4.1.3.1. EPIDEMIOLOGICOS.....	52
4.1.3.2. CLÍNICOS.....	52
4.1.3.3. ECOCARDIOGRÁFICOS.....	52
4.1.3.4. MICROBIOLÓGICOS .....	53
4.1.3.5. TERAPEÚTICOS.....	53
4.1.4. PROCEDIMIENTOS .....	53
4.1.4.1. CLÍNICOS .....	53
4.1.4.2. ECOCARDIOGRAFICOS .....	53
4.1.4.3. MICROBIOLÓGICOS .....	54
4.1.4.3.1. CULTIVOS .....	54
4.1.4.3.2. DETECCION DE P. ACNES MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL (RT-PCR).....	55
4.1.4.3.2.1. SONDAS FRET .....	58
4.1.4.3.2.2. SYBR-GREEN .....	59
4.1.4.4. ANATOMOPATOLÓGICOS:.....	61



4.2. <u>INVESTIGACIÓN BÁSICA</u> .....	62
4.2.1. LA BIOCAPA DEL <i>PROPIONIBACTERIUM ACNES</i> .....	62
4.2.1.1. DESARROLLO Y OBTENCIÓN DE BIOCAPA <i>IN VITRO</i> .....	62
4.2.1.2. VISUALIZACIÓN DE LA BIOCAPA DE <i>PA</i> .....	67
4.2.1.2.1. MARCAJE CON ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	67
4.2.1.2.2. TINCIÓN CON CALCOFLUOR.....	69
4.2.2. DETERMINACIÓN DEL BIOTIPO DE <i>PROPIONIBACTERIUM ACNES</i> .....	71
4.2.3. DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN VEGF EN SANGRE PERIFERICA DE LOS PACIENTES CON EIVPPA.....	72
5.- <u>RESULTADOS</u> .....	75
5.1. <u>INVESTIGACIÓN CLÍNICA</u> .....	76
5.1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS MÁS REPRESENTATIVOS .....	76
5.1.1.1. CASO 1 .....	76
5.1.1.2. CASO 3 .....	78
5.1.1.3. CASO 4 .....	79
5.1.1.4. CASO 6 .....	79
5.1.1.5. CASO 13 .....	81
5.1.2. CLÍNICA .....	
5.1.2.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	82
5.1.2.2. CLÍNICA.....	84

## INDICE

5.1.2.3.	ECOCARDIOGRAFÍA.....	86
5.1.2.4.	MICROBIOLOGÍA .....	89
5.1.2.4.1.1.	CULTIVOS .....	89
5.1.2.4.1.2.	BIOLOGÍA MOLECULAR: DETECCIÓN DE <i>P. ACNES</i> MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL .....	91
5.1.2.5.	TRATAMIENTO Y EVOLUCIÓN .....	94
5.1.2.6.	DESCRIPCION MACROSCOPICA.....	98
5.1.2.7.	HISTOLOGÍA.....	99
5.2.	<b><u>INVESTIGACIÓN BÁSICA</u></b> .....	101
5.2.1..	LA BIOCAPA DEL <i>PROPIONIBACTERIUM ACNES</i> .....	101
5.2.1.1.	DESARROLLO Y OBTENCIÓN DE BIOCAPA.....	101
5.2.1.2.	VISUALIZACIÓN DE LA BIOCAPA DE <i>PROPIONIBACTERIUM ACNES</i> .....	103
5.2.1.2.1.	TINCIÓN CON ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	103
	A. MICROSCOPIA DE INMUNOFLOURESCENCIA.....	103
	B. MICROSCOPIA LASER CONFOCAL.....	105
5.2.1.2.2.	TINCION CON CALCOFLUOR.....	107
5.2.2.	LOS BIOTIPOS DEL <i>PROPIONIBACTERIUM ACNES</i> .....	107
5.2.3.	DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN VEGF EN SANGRE PERIFERICA DE LOS PACIENTES CON EIVPPA.....	109

6.	<b><u>DISCUSIÓN</u></b> .....	110
	• DISCUSION SOBRE LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA .....	111
	• DISCUSION SOBRE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA.....	132
7.	<b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	138
8.	<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	140
9.	<b><u>PUBLICACIONES</u></b> .....	157
	❖ GUÍO L, SARRIÁ C, DE LAS CUEVAS C, GAMALLO C, DUARTE J. <i>ENDOCARDITIS CRÓNICA SOBRE VÁLVULA PROTÉSICA POR PROPIONIBACTERIUM ACNES: UNA CAUSA INSOSPECHADA DE DISFUNCIÓN PROTÉSICA</i> . REV ESP CARDIOL. 2009; 62(2):167-77	
	❖ GUÍO L, SARRIÁ C, <b>DE LAS CUEVAS C, ALARCÓN A, SALA-VALDÉS M, SÁNCHEZ-MADRID F.</b> <i>DEMOSTRACION DE LA FORMACIÓN DE BIOCAPA POR PROPIONIBACTERIUM ACNES SOBRE VÁLVULA PROTÉSICA IN VITRO</i>	
	• ENFERM INFECC MICROBIOL CLIN 2008; 26:148-9	
	• POSTER	

# **INTRODUCCIÓN Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA**

---

### 1.1 INTRODUCCIÓN

A lo largo de los últimos 15 años han sido diagnosticados y seguidos en el Hospital de La Princesa 14 casos de endocarditis infecciosa sobre válvula protésica por *Propionibacterium acnes* (EIVPPA). Otros dos casos fueron diagnosticados en otros centros y remitidos a nuestro hospital para su inclusión en esta serie. Todos ellos reunían características clínicas, ecocardiográficas, microbiológicas y anatómicas similares, y bastante diferenciadas de las habituales. Estas características podrían ser fruto de una peculiar fisiopatología de este microorganismo y podrían motivar en algunos casos un retraso importante en el diagnóstico de la endocarditis. Este patógeno ha sido, clásicamente, infravalorado en cuanto a su patogenicidad y menospreciado, muchas veces, cuando su presencia era detectada.

El presente trabajo se trata de un estudio traslacional, con una primera parte de investigación clínica, en la que se describe la forma de presentación y comportamiento de la endocarditis infecciosa sobre válvula protésica por *Propionibacterium acnes* (EIVPPA) a través de la descripción minuciosa de los 16 casos y una segunda parte de investigación básica, en la que se exploran mecanismos fisiopatológicos, microbiológicos, histopatológicos e inmunológicos de esta enfermedad, tales como la formación de biocapa, el estudio de los polimorfismos del factor de crecimiento endotelial vascular (VGEF), así como el diagnóstico de la EIVPPA mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en tiempo real.

## 1.2 PROPIONIBACTERIUM ACNES

### 1.2.1 GENERALIDADES

El *Propionibacterium acnes* (PA) es un bacilo anaerobio gram positivo, no móvil, no formador de esporas, clásicamente denominado *Bacillus acnes*, *Corynebacterium acnes* o *Corynebacterium parvum*. Bioquímicamente se caracteriza por tener reacciones indol y catalasa positivas y producir ácido propiónico. Aunque se le considera un anaerobio estricto, posee enzimas detoxificantes de oxígeno por lo que puede tolerar atmósferas con un 100% de saturación de oxígeno, aunque con tasas de crecimiento inferiores. Es asimismo capaz de sobrevivir en condiciones anaeróbicas más de 8 meses sin necesidad de subcultivos, lo cual sugiere que podría sobrevivir en tejidos humanos con bajos potenciales oxidativos durante periodos muy largos de tiempo.

Forma parte de la flora habitual de la cavidad oral, el epitelio húmedo de la conjuntiva, el conducto auditivo externo, el tracto respiratorio superior y el intestino delgado <sup>(1)</sup>, y, fundamentalmente, de la piel. Es en ésta última donde predomina, constituyendo aproximadamente la mitad del total de la flora saprofita. Su localización preferente es en el interior de los folículos pilosebáceos, especialmente donde éstos abundan, esto es, en la cara, el cuero cabelludo y la parte superior del tronco. Es en la piel donde,

clásicamente, ha tenido su papel más importante, al ser fundamental en la patogenésis del acné vulgar inflamatorio. Por su condición de saprófito, se le ha considerado, generalmente, de baja virulencia, y se le ha catalogado, de forma demasiado generalizada, como contaminante de las muestras microbiológicas. Sin embargo su implicación en procesos graves, como endoftalmitis, abscesos cerebrales, osteomielitis, empiema subdural, infecciones de drenajes ventriculares cerebrales, artritis sépticas y endocarditis infecciosa está siendo descrita cada vez con más frecuencia en la literatura <sup>(2-40)</sup>. Las comunicaciones publicadas son, generalmente, de casos aislados o de series cortas retrospectivas <sup>(13, 32,37)</sup> que no inciden en todos los aspectos de la enfermedad.

Es considerado como un patógeno oportunista, siendo los factores de riesgo más importantes el antecedente de cirugía previa, el traumatismo penetrante y, sobre todo, la presencia de material protésico. En concreto, dentro de las endocarditis, son más frecuentes los casos descritos sobre válvula protésica que sobre válvula nativa. También se han descrito infecciones sobre otros dispositivos intracardiacos: marcapasos, desfibriladores, tubos valvulados aórticos, parches ventriculares o anuloplastias <sup>(22, 26-29, 32, 34, 38)</sup>. Pero también se ha visto involucrado en otras enfermedades no infecciosas con componente inflamatorio, como sarcoidosis <sup>(41,42)</sup>, vasculitis <sup>(43)</sup>, ciática <sup>(44)</sup>, o síndrome SAPHO <sup>(45-50)</sup>.

El *PA* es una bacteria de crecimiento lento, por lo que puede no ser identificada si los hemocultivos o las muestras quirúrgicas no se someten a una incubación prolongada <sup>(9, 14, 19, 23, 32, 35, 39)</sup>. La presencia de un inóculo pequeño de bacterias

en tejidos o dispositivos puede ser, en parte, la causa de los “falsos negativos” en estas muestras. Utilizando técnicas como la trituración se ha obtenido un mayor rendimiento en las muestras tisulares <sup>(16)</sup>. Es posible, incluso, que su presencia en tejidos pueda no objetivarse a través de cultivos habituales, incluso tras 30 días de incubación, y sólo pueda ser confirmada por técnicas de biología molecular (PCR) <sup>(31,32, 51)</sup>.

### 1.2.2 VIRULENCIA Y PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS

La patogenicidad del *PA* se debe a su capacidad para excretar productos exocelulares bioactivos, y a sus interacciones con el sistema inmunitario.

Es sabido desde hace tiempo, gracias a varios estudios realizados en acné, que las especies de *Propionibacterium* son capaces de excretar enzimas y metabolitos, que pueden dañar directamente el tejido del hospedador <sup>(52)</sup>, así como sustancias con propiedades inmunoestimuladoras sobre células del sistema mononuclear fagocítico. Serían estas células las que iniciarían una compleja respuesta inmune, con activación de la vía del complemento, estimulación de la liberación de enzimas lisosómicas desde los neutrófilos y la producción de factores quimiotácticos de neutrófilos, así como de citoquinas proinflamatorias, como interleuquina (IL) 1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12 y TNF-  $\alpha$  <sup>(53)</sup>. En concreto, se ha sugerido que es la presencia del TNF-  $\alpha$  la que promueve la formación de los granulomas <sup>(54)</sup>, lo que podría ser la causa de la importante asociación entre el *PA* y la sarcoidosis <sup>(41,42)</sup>. Asimismo se ha descrito un



importante aumento de la actividad de lipasas en la biocapa producida por *PA* in vitro <sup>(55)</sup>. Las lipasas del *PA* juegan un importante papel en la patogenia del acné, ya que aumentan la presencia de ácidos grasos localmente, los cuales son muy irritantes, y contribuyen, significativamente, a la inflamación. Además, la lipasa, por sí misma, puede actuar como sustancia estimuladora de neutrófilos.

*PA* es capaz de resistir la fagocitosis sobreviviendo como microorganismo intracelular en el interior de los macrófagos. Esta resistencia a la fagocitosis puede ser atribuible a la compleja estructura de su pared celular, impermeable y provista de una capa fibrilar <sup>(56)</sup>; es esta pared celular y sus características las que, se cree, confieren la actividad inmunoestimuladora anteriormente descrita.

Estas interacciones entre el *PA* y el sistema inmune han llevado a numerosos investigadores a emplear a este microorganismo como potente coadyuvante con actividad antitumoral en modelos experimentales <sup>(57,58)</sup>. La inyección de bacterias de *PA* inviables tras calor - antes o simultáneamente con microorganismos (bacterias patógenas, virus, parásitos) o células tumorales - ha mostrado, invariablemente, una parcial o total protección frente a la infección o a la neoplasia en estudio, en varios modelos animales. Sin embargo, estos resultados han sido decepcionantes porque esta inmunoprotección únicamente sería beneficiosa en estadios tumorales precoces <sup>(57)</sup>, por lo que las investigaciones actuales en cuanto a la inmunomodulación por *PA*, se están dirigiendo únicamente a las terapias

coadyuvantes en vacunación veterinaria <sup>(59)</sup>.

Son numerosos los trabajos sobre *PA* y su patogenia en el acné, y muchos de ellos le atribuyen la responsabilidad del inicio de la inflamación dentro del comedón, si bien su sola presencia no es suficiente para explicar todo el cuadro inflamatorio del acné. Pero en otras enfermedades, en concreto la endocarditis, no existen apenas trabajos que analicen la patogenia de este microorganismo. Incluso se ha postulado que el *PA* que habita en los folículos pilosebáceos puede no mostrar las mismas propiedades inmunoestimuladoras que el *PA* aislado en otras infecciones <sup>(60)</sup>. Existe un trabajo que compara el comportamiento del *PA* en el acné y en la endocarditis en cuanto a la estimulación de linfocitos, en el que se concluye que la estimulación linfocitaria por parte del *Propionibacterium* en la endocarditis puede ser más escasa que en el acné <sup>(61)</sup>, y justificar, por tanto, en parte el comportamiento en muchas ocasiones crónico de esta enfermedad.

### 1.2.3. PROPIONIBACTERIUM ACNES TIPO I Y II

Johnson y Cummins publicaron en 1972 datos acerca de la existencia de dos tipos distintos de *PA* <sup>(62)</sup>, a los que denominaron tipo I y II, distinguiéndolos en cuanto a la composición de los carbohidratos de su pared, y en cuanto a la diferente respuesta en los test serológicos por aglutinación.

A lo largo de los años se han ido desarrollando otros métodos capaces de

diferenciar ambos tipos, entre los que está la inmunofluorescencia con anticuerpos policlonales, aunque, de todos, seguían siendo los métodos serológicos los más específicos.

No obstante, a pesar de los esfuerzos en desarrollar nuevas técnicas de identificación, existe una importante confusión en la literatura acerca de la nomenclatura de los distintos tipos de *PA*, sin duda fruto de los distintos resultados en función de las distintas técnicas realizadas. Y así, por ejemplo, hay un trabajo en los que se distinguen 5 biotipos (B1, B2, B3, B4 y B5) en función del tipo de ácidos grasos libres que estos secretan, y 3 serotipos (IA, IB y II) en función de la respuesta serológica que estos producen <sup>(63)</sup>.

Los últimos trabajos hacen mención fundamentalmente a los tipos I (subclasificado a su vez en Ia y Ib) y II, haciendo referencia al tipo de azúcares que componen su pared. Dicha distinción es la que tiene mayor acogida dentro de la literatura en la actualidad. En los últimos años se han publicado estudios que muestran las diferencias entre ambos subtipos: a través de la inmunofijación con dos anticuerpos monoclonales distintos QUBPa1 (específico para *PA* tipo I) y QUBPa2 (específico para *PA* tipo II), midiendo la capacidad de fermentar sorbitol, presente únicamente en el tipo I, secuenciando y comparando el gen *recA*, implicado en la replicación celular <sup>(64)</sup>, y midiendo la diferente expresión del factor CAMP (enzima conocida en otros microorganismos como el *Streptococcus agalactiae*, capaz de producir una reacción co-hemolítica entre eritrocitos humanos y ovinos) en los distintos tipos, detectando una mayor producción de factor CAMP en los *PA* tipo IB y II, comparado con el producido con el tipo IA <sup>(65)</sup>.

El papel que los *PA* tipos I y II juegan en las distintas infecciones y sus factores de virulencia, potencialmente diferentes, no han sido estudiados en profundidad. Higaki relacionó al biotipo B3 con una mayor severidad del acné y una mayor tasa de replicación bacteriana <sup>(63)</sup>. Mc Dowell et al <sup>(64)</sup> analizaron un total de 132 cepas distintas de *PA* aisladas de distintas muestras de tejidos - tejido periprotésico de prótesis de cadera disfuncionantes por infección, piel de pacientes con acné, piel de pacientes sometidos a cirugía de columna, o muestras de infecciones dentales – y se determinó el tipo a través de la tinción con los anticuerpos monoclonales QUBPa1 y QUBPa2. Entre sus resultados destaca la mayor presencia del tipo II en las muestras obtenidas de prótesis de cadera disfuncionantes (70%), mientras que en el resto la predominancia era del tipo I (en acné 88,89%; en piel de pacientes intervenidos de cirugía de columna 100%; en infecciones dentales 100%). Se detectó un 8% de cepas que no pudieron ser tipadas mediante estos AcMo, teniendo que recurrir a las otras técnicas anteriormente descritas.

Recientemente, además, se ha descrito la existencia de un nuevo subtipo (Tipo III) en función de una morfología distinta respecto de los otros subtipos tras la tinción con el anticuerpo monoclonal específico para *PA* QUBPa3 <sup>(66)</sup>. La relación entre estos tres tipos y su comportamiento en la infección sigue sin estar bien establecida.

#### 1.2.4. LA ENDOCARDITIS POR *PROPIONIBACTERIUM ACNES* EN LA LITERATURA

El *PA* es el microorganismo anaerobio, después de *Bacteriodes fragilis*, que con más frecuencia causa EI. En una revisión de 67 casos de la bibliografía, las bacterias anaerobias no estreptocócicas fueron responsables del 1,3% de todos los casos de EI, siendo *Bacteroides fragilis* el más frecuente, y correspondiendo a *PA* menos de 1/1000 de las mismas <sup>(67)</sup>. La incidencia de EIVPPA descrita en otros centros va desde 0,4 casos/año (en un centro cardiorácico de referencia francés) <sup>(32)</sup> hasta 1,4 casos/año en un centro inglés que atiende a 700000 habitantes <sup>(33)</sup>.

La búsqueda de los casos de endocarditis por *PA*, reportados en la literatura, se hizo mediante la introducción de los términos “*Propionibacterium acnes*” y “endocarditis” en la base de datos Pubmed. Otras referencias fueron seleccionadas a partir de la bibliografía de los artículos ya conseguidos.

En total hay 67 casos de EI por *PA* descritos en 36 artículos de la literatura. De estos, 4 casos no han podido analizarse, 3 por estar publicados en revistas francesas de difícil acceso <sup>(10, 17,20)</sup> y 1 por estar escrito en Japonés <sup>(6)</sup>.

Han sido analizados 63 casos de EI por *PA* publicados en la literatura (**ver tabla 1**). Cinco publicaciones han sido analizadas sólo parcialmente (5 casos en polaco <sup>(13)</sup>, y 4 casos en inglés <sup>(12, 18, 36, 38)</sup> por no haberse conseguido el artículo en su totalidad. Exceptuando las series de Abramczuk <sup>(13)</sup>, Delahaye

## INTRODUCCIÓN Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

<sup>(32)</sup> y Lalani <sup>(37)</sup>, de 5, 11 y 15 pacientes respectivamente, el resto son todos casos aislados.

Cuarenta y cuatro casos 44 (69%) asentaron sobre dispositivos intracardiacos: prótesis valvulares 34 (53%) <sup>(9,11,12,13,14,15,16,18,21,31,32,33,35,36,37,39)</sup>, prótesis valvular y marcapasos 2 <sup>(27,40)</sup>, marcapasos 4 <sup>(22, 28, 32, 38)</sup>, desfibrilador 1 <sup>(32)</sup>, parche de teflón 1 <sup>(26)</sup>, tubo valvulado 1 <sup>(34)</sup> y anuloplastia mitral 1 <sup>(29)</sup>. En los restantes 19 casos, la EI por PA afectó a válvulas nativas en 16 <sup>(5,7,8,13,19,23,24,25,32,33,37)</sup> y/o a defectos congénitos en 3 <sup>(30,32)</sup>.

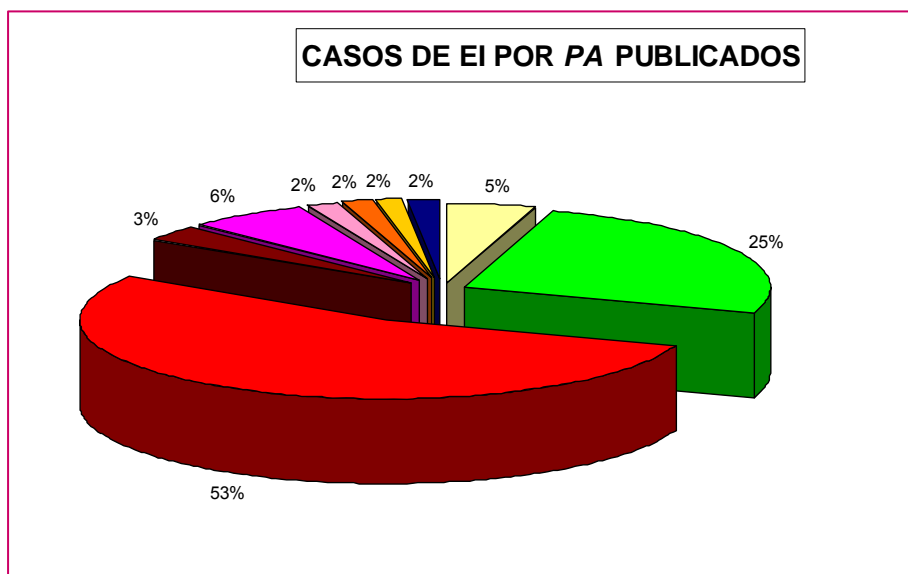


TABLA1: DATOS EPIDEMIOLÓGICOS Y CLÍNICOS DE 63 CASOS DE EI POR PROPIONIBACTERIUM ACNES DESCRITOS EN LA LITERATURA

**DNE:** Datos no especificados en artículo. **DND:** No se dispone del artículo en su totalidad (dato no disponible). **Nz:** Válvula nativa. **P:** Válvula protésica (no especificada). **NAo:** Válvula nativa aórtica. **NMI:** Válvula nativa mitral. **PAo:** Prótesis aórtica. **PMi:** Prótesis mitral. **PMetAo:** Prótesis metálica aórtica. **PMetMi:** Prótesis metálica mitral. **PMet:** Prótesis metálica (sin especificar localización). **MPS:** Marcapasos. **TEF:** Parche de teflón. **AnMi:** Anuloplastia mitral. **MC:** Malformación congénita. **DF:** desfibrilador. **Tubvalv:** Tubo valvulado aórtico. **PBoAo:** Prótesis biológica aórtica. **D:** Días. **M:** Meses. **A:** Años. **ACVA:** Accidente cerebrovascular agudo. **MEG:** malestar general. **ICC:** insuficiencia cardíaca congestiva. **AIT:** Accidente isquémico transitorio. **HC:** Hemocultivos. **(\*)** nº de días de incubación hasta el crecimiento, cuando éste se reportó. **(-):** ausencia de datos (paciente no intervenido quirúrgicamente). **TTO QCO:** Tratamiento quirúrgico realizado (sí/no). **PENI:** Penicilina. **AG:** Aminoglicósidos. **CLOX:** Cloxacilina. **CLIN:** Clindamicina. **CEF 3:** Cefalosporinas de 3º generación. **AMPI:** Ampicilina. **VAN:** Vancomicina. **RIF:** Rifampicina. **IMIPem:** Imipenem. **AMOX:** Amoxicilina. **QUIN:** Quinolonas. **MET:** Metronidazol; **DAP:** Daptomicina. **βLAC:** Beta-lactámicos. **DOXI:** Doxiciclina.

CASOS DE EIVPPA



CASOS DE EI POR PA SOBRE VÁLVULA NATIVA U OTROS DISPOSITIVOS



Caso (Referen cia)	Tipo de válvula o disposi- tivo	Tiempo desde implanta- ción hasta síntomas	Factor de riesgo (tiempo desde el suceso hasta síntomas)	Presentación clínica (Retraso diagnóstico en días)	ECOCARDIOGRAFIA (tiempo entre distintas exploraciones)	DATOS MACROSCÓPICOS HISTOLOGÍA	MICROBIOLOGÍA		TTO QCO (SI/NO)	ANTIBIOTERAPIA	EVOLUCION
							HC (nº) <sup>(*)</sup>	Válvula o prótesis (nº) <sup>(*)</sup>			
(5)	NAo	-	Endocarditis reciente por Estreptococo grupo B	ACVA isquémico, descompensación diabética, nuevo soplo, esplenomegalia, endocardio séptico (80)	IaO severa	<i>Proliferación fibrinohistocítica e hialinización, necrosis fibrinohistocítica, neovascularización, colonias bacterianas</i>	P. acnes 3/3 + SCN 1/6	P. acnes	SI	CLIN	Favorable
(7)	Nao	-	DNE	Fiebre, MEG (60)	DNE	(-)	P. acnes	(-)	NO	CEF 3	Favorable
(8)	NMI y NAo	-	Amigdalitis de repetición	Fiebre, artromialgias, nódulos de Osler, nuevo soplo (42)	Doble lesión aórtica ya conocida	(-)	P. acnes 4/7	(-)	NO	PENI + AG	Favorable
(9)	PMi	19 M	Herida por pinchazo en dedo (1M)	MEG, sudoración, artritis tobiolo, Nódulos de Osler, hemorragias en astilla, nuevo soplo. (21)	1º: Normal 2º (10 D): IaO, no vegetaciones 3º (Recalida, 5 M): Sin cambios	(-)	P. acnes 3/3 (14) Recalida: P. acnes 3/3 (14)	(-)	NO	AMPI + AG	Recalida
(11)	PAo	DNE	Acupuntura (14 D)	Fiebre, MEG (21)	1º: No vegetaciones. 2º (8 D): Vegetación aórtica.	(-)	P. acnes 2/3	(-)	NO	PENI + AG	Favorable
(12)	PAo	DND	DND	ICC (DND)	IaO severa	Desinserción protésica, pseudoaneurisma en anillo aórtico DND	-	P. acnes	SI	DND	Favorable
	NMI	-	DND	DND	DND	DND	-	P. acnes + Neisseria Sp	SI	DND	Favorable
	NMI	-	DND	DND	DND	(-)	P. acnes	(-)	NO	DND	Favorable
(13)	PMet	DND	DND	DND	DND	(-)	P. acnes + SCN	(-)	NO	DND	Exitus
	PMet	DND	DND	DND	DND	(-)	P. acnes	(-)	NO	DND	Favorable
	PMet	DND	DND	DND	DND	(-)	P. acnes	(-)	NO	DND	Favorable
(14)	PMetAo	3 A	DNE	ACVA hemorrágico, fiebre (1)	IaO, absceso	Absceso DNE	P. acnes 4/4 (6 y 14)	No cultivada	SI	PENI + AG	Favorable
(15)	PMetMI	11 A	DNE	ICC, distensión protésica progresiva, nuevo soplo, sd constitucional, fiebre (540)	IMI	Absceso evolucionado, vegetaciones DNE	P. acnes 5/7	Negativo	SI	PENI + AG VAN	Favorable
(16)	PMetAo	21 D	Recambio valvular	Fiebre, trinitona, cefalea, ACVAs, nuevo soplo (49)	Vegetaciones, IaO , absceso paravalvular	Datos de endocarditis en el anillo, absceso COLONIAS BACTERIANAS	P. acnes 6/16 (7)	P. acnes (14)	SI	PENI	Favorable
(18)	PAo	DND	DND	DND	Absceso	DND	P. acnes (7)	P. acnes	SI	DND	Exitus
(19)	NAo	-	DNE	Fiebre, escalofríos, dolor torácico pleurítico, nuevo soplo (5)	Vegetación, EAO moderada, IaO progresiva, absceso	Absceso, vegetaciones DNE	P. acnes 3/5 (10)	No cultivada	SI	VAN + AG+ IMIP	Favorable
	PMetAo	3A 6 M	No encontrado	Fiebre, MEG (DNE)	IaO, vegetaciones	Absceso, vegetaciones DNE	P. acnes 3/3	No cultivada	SI	AMOX	Exitus en postoperatorio
(21)	PMetAo	3 A	No encontrado	Fiebre, AIT (690)	1º: Normal 2º (9 M): IaO periprotésica 3º (recalida): IaO periprotésica, absceso	Desinserción de la válvula, lesiones sugerentes de endocarditis en resolución DNE	Negativos	P. acnes	SI	VAN + QUIN	Recalida

Caso	Tipo de válvula o dispositivo	Tiempo desde implantación hasta síntomas	Factor de riesgo (tiempo desde el suceso hasta síntomas)	Presentación clínica	ECOCARDIOGRAFIA (tiempo entre distintas exploraciones)	DATOS MACROSCÓPICOS HISTOLOGÍA	MICROBIOLOGÍA		TTO QCO (SI/NO)	ANTIBIOTERAPIA	EVOLUCION
							HC (nº) (1)	Válvula o prótesis (nº) (1)			
(22)	MPS	DNE	DNE	ACVA, fiebre con escalofríos, sudoración, MEG(180)	1º: IMI leve, IT, no vegetaciones 2º: Vegetación de 5 cm en cable de marcapasos	DNE  Trombo organizado, colonias bacterianas	P. acnes	P. acnes	SI	QUIN + MET AMPI + AG	Favorable
(23)	NAo	-	DNE	Fiebre, ICC, nuevo soplo (14)	IAo, vegetaciones, no abscesos	Absceso anular en el seno no coronario DNE	Negativos	P. acnes (21)	SI	VAN + AG	Favorable
(24)	NMI y NAO	-	Trasplante hepático (2 A)	Fiebre, ICC (14)	IAo severa, IMI moderada, no vegetaciones	Vegetaciones sugerentes de endocarditis en ambas válvulas Esclerosis, vegetaciones friables, degeneración mixoide del tejido conectivo, depósitos calcícos, exudados fibrinosos, infiltrado neutrofílico, tejido de granulación, colonias bacterianas	Negativos	P. acnes	SI	VAN + AG	Favorable
(25)	NAo	-	DND	DND	Absceso	DND	P. acnes (6)	Negativo	SI	DND	Favorable
(26)	Tef	20 M	DNE	Fiebre, nuevo soplo (8)	IMI, no vegetaciones, hipoquinesia ventriculo izquierdo	DNE	P. acnes 8/14 (8)	No cultivada	SI	AMOX + AG CEFA 3	Favorable
(27)	MPS PMeAo y PMetMI	5 A	DNE	Fiebre, síntomas respiratorios (DNE)	Vegetaciones en cable y PMI, dehiscencia periprotésica mitral.	Absceso anular y vegetaciones sobre prótesis mitral Presencia de bacilos gram positivos	P. acnes 2/7	P. acnes	SI	AMOX	Favorable
(28)	MPS	DNE	2 recambios del marcapasos	Fiebre, nuevo soplo (2)	Vegetaciones en cable, IT leve	(-)	P. acnes 5/7	(-)	NO	AMPI	Favorable
(29)	AN MI	8 M	Recambio valvular, acné	Díscnea, nuevo soplo (DNE)	IMI masiva, válvula posterior inmóvil	Desinserción del anillo, displasia de la válvula anterior, cuerdas tendinosas rotas. DNE	Negativos (5)	P. acnes	SI	AMOX	Favorable
(30)	MC	DNE	DNE	Fiebre, MEG, nuevo soplo, FRA (240)	IT, vegetación en válvula tricúspide	DNE	P. acnes 5/5	No cultivada	SI	AMPI + IMIP	Favorable
(31)	PMeAo	11 A	DNE	Fiebre, escalofríos, dolor abdominal, diarrea, nuevo soplo (240)	1º: Vegetación aórtica 2º (21 D): dehiscencia periprotésica	Absceso en raíz aórtica DNE	P. acnes 7/7	Negativo	SI	PENI + CLIN	Favorable
	PMeAo	DNE	DNE	Fiebre, nuevo soplo, embolismo esplénico (DNE)	Absceso periaórtico, dehiscencia periprotésica	Sugiente de endocarditis, colonias bacterianas	P. acnes 2/3 (12)	Negativo	SI	DNE	Favorable
	PMeAo	DNE	Herida infectada en dedo, pericardioenteritis	Fiebre, embolismo esplénico (DNE)	ETE: Absceso periaórtico, vegetaciones aórticas y mitrales	Sugiente de endocarditis, colonias bacterianas	P. acnes 3/3 (6)	Negativo	SI	DNE	Exitus
	NMI	-	DNE	ICC (DNE)	ETT: EMI severa	DNE Sugiente de endocarditis, colonias bacterianas	-	P. acnes (10)	SI	DNE	Exitus
	NMI	-	Escara en talón	DNE	ETT: EMI severa	DNE Sugiente de endocarditis	-	P. acnes (8 y 30)	SI	DNE	Favorable
(32)	PMeAo	DNE	DNE	Fiebre, ICC (DNE)	Absceso periaórtico, desinserción protésica	Sugiente de endocarditis, colonias bacterianas	P. acnes 2/3 (5)	Negativo	SI	DNE	Exitus
	PMeAo	DNE	DNE	ICC, nuevo soplo, ACVA, espondilodiscitis (DNE)	Absceso periaórtico, dehiscencia periprotésica	Sugiente de endocarditis	P. acnes 6/6 (10)	Negativo	SI	DNE	Favorable
	MPS	DNE	Recambio de cables de marcapasos	Fiebre, síncope (DNE)	Vegetaciones en cable	DNE Sugiente de endocarditis	P. acnes 2/3 (14)	P. acnes (7)	SI	DNE	Favorable
	DF	DNE	Punción de la bolsa del desfibrilador	Fiebre, TEP (DNE)	Vegetaciones en cable	DNE Sugiente de endocarditis	P. acnes 9/11	P. acnes	SI	DNE	Favorable
	MC	DNE	Sinusitis maxilar de repetición	Fiebre (DNE)	DNE	(-)	P. acnes 4/7 (8)	(-)	NO	DNE	Favorable
	Na	DNE	Otitis de repetición	Fiebre, ICC, nuevo soplo (DNE)	ETT: Absceso en aorta ascendente, vegetaciones aórticas	DNE Sugiente de endocarditis	P. acnes 2/4	Negativo	SI	DNE	Favorable
	MC	DNE	Neumopatía	Fiebre, aumento de soplo previo (DNE)	ETT: Absceso del istmo aórtico	DNE Sugiente de endocarditis	P. acnes 3/6 (15)	Negativo	SI	DNE	Favorable
(33)	PMeAo y PMetMI	4 A	Endocarditis previa (4 A)	MEG, postración, sudoración, macúlas, hemorragias en asfía, nuevo soplo (30)	1º Normal 2º (21 D): Leak periprotésico aórtico 3º (45 D): Absceso de raíz aórtica, IAo moderada	Destrucción de la raíz aórtica DNE	P. acnes 7/14 (8)	Bacilos gram +, cultivo fallido	SI	VAN + RIF	Exitus



Caso	Tipo de válvula o dispositivo disponible	Tiempo desde implantación hasta síntomas	Factor de riesgo (tiempo desde el suceso hasta síntomas)	Presentación clínica	ECOCARDIOGRAFIA (tiempo entre distintas exploraciones)	DATOS MACROSCÓPICOS HISTOLOGÍA	MICROBIOLOGÍA		TRATAMIENTO QCO (SI/NO)	ANTIBIOTERAPIA	EVOLUCIÓN
							HC (nº) <sup>(1)</sup>	Válvula o prótesis (nº) <sup>(1)</sup>			
(33) (contin.)	NMI	-	DNE	ICC, asenia, nuevo soplo (270)	IMI	Fibrosis de ambas valvas y fusión del aparato subvalvular DNE	-	P. acnes	SI	PENI + AG + RIF	Exitus
	NMI	-	Bypass femoropoplíteo (9 A)	ICC, sd constitucional, fiebre (7)	IMI severa, valvas calcificadas, probable vegetación.	(-)	P. acnes 1/4 (5)	(-)	NO	VAN + AG + RIF	Exitus
(34)	Tub/valv	2 A	Cultivo derrame pericárdico + Propionibacterium (23 M)	ICC, escalofríos, sudoración, nuevo soplo, hemorragias en astilla (30)	Gran absceso en raíz aórtica y vegetación en prótesis aórtica	DNE	P. acnes 1/2 (3)	P. acnes	SI	PENI DAPT	Favorable
(35)	PMet/Ao y PMet/MI	5 A	DNE	ICC, dehiscencia protésica aguda (1)	Dehiscencia protésica mitral a lo largo del anillo anterior	Desinserción de la mitad del anillo protésico, con tejido friable y suturas deshechas, sin datos de endocarditis DNE	Negativos (5)	P. acnes (8)	SI	PENI	Favorable
(37)	PAo	DND	DND	DND	DND	Absceso DND	DND	DND	SI	DND	Favorable
	P	DNE		DNE	DNE				SI	DNE	Favorable
	P	DNE		DNE	ETE: Vegetación aórtica				NO	DNE	Favorable
	PMet/MI	DNE		DNE	ETE: Vegetación mitral				NO	DNE	Favorable
	PBio/Ao	DNE		DNE	ETE: Vegetación mitral				NO	DNE	Favorable
	P	DNE		DNE	DNE				SI	DNE	Exitus
	PBio/Ao	21 A		DNE	ETE: Vegetación aórtica				SI	VAN + AG	Favorable
	PAo	9 A	DNE	ACVA (DNE)	ETE: Vegetación aórtica + absceso	DNE	DNE	DNE	NO	βLAC + VANCO + AG	Exitus
	PMet/Ao	4 A		DNE	DNE				SI	βLAC + CLIN	Favorable
	PMet/Ao y PMet/MI	23 A		DNE	DNE				SI	βLAC	Favorable
	PMet/Ao	7 A		ICC, ACVA (DNE)	DNE				SI	βLAC + AG	Favorable
	PMet/Ao	23 A		DNE	ETE: Vegetación aórtica y absceso				SI	βLAC	Favorable
	PMet/Ao	17 A		DNE	ETE: Vegetación mitral				NO	βLAC + DOXI	Recalida (4 veces)
(38)	PMet/Ao	4 A		DNE	ETE: Vegetación aórtica				SI	βLAC + VANCO + AG	Favorable
	Na	-		ICC (DNE)	Absceso	DNE	DNE	DNE	SI	βLAC + AG	Favorable
	Na/Ao	-	DNE	DNE	ETE: Vegetación aórtica	DNE	DNE	DNE	SI	βLAC	Favorable
(39)	MPS	9 A	Recambio batería de marcapasos (2 A 6 M)	Fiebre y glomerulonefritis hipocomplementémica (DND)	ETE: Pequeña vegetación en cable de marcapasos	(-)	P. acnes 13/13	(-)	NO	CLIN	Favorable
(39)	PMet/Ao	15 M	No encontrado	Fiebre, AIT DNE	ETT: IAO leve ETE (7 D): Gran vegetación en una de las valvas y absceso en raíz aórtica. IAO moderada.	DNE Bacilos gram positivos	Negativos	P. acnes (28)	SI	PENI	ACVA isquémico postoperatorio Abscesos esplénicos
(40)	PMet/Ao + MPS	3 A	No encontrado	Fiebre	ETT: 1 gradiente transvalvular, engrosamiento válvula ETE: Absceso en anillo	Desinserción del anillo, absceso perianular Datos sugerentes de EI	P. acnes 6/6 (15)	P. acnes en válvula y cable. PCR+	SI	AMOX + AG AMOX + RIF	Favorable

### **A. DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS PUBLICADOS DE EIVPPA**

Son, por tanto, 37 los casos de EIVPPA descritos en la literatura (incluyendo los casos de afectación simultánea de válvula protésica y marcapasos, y el caso de tubo valvulado), lo que corresponde a un 58% de todas las EI por PA de la literatura, lo que sugiere una especial predilección por el asentamiento sobre el material protésico.

La comparación de los distintos artículos de EIVPPA es difícil, dada la gran heterogeneidad con la que se describen los distintos aspectos de la enfermedad, pero se muestra una relativa homogeneidad de signos clínicos que han permitido sacar las principales características y compararlas con los casos del presente trabajo. Uno de los casos <sup>(36)</sup> no se incluye en el análisis por no disponer del artículo en su totalidad.

La edad media de los pacientes con EIVPPA es de 54,1 años (rango 29-79). Treinta y dos pacientes eran hombres. Veintiséis se localizaron en prótesis metálicas (3 mitrales, 15 aórticas, 4 mitroaórticas y 1 tubo valvulado metálico, 3 de localización no especificada) y 2 en biológicas (1 aórtica y 1 mitral). En 9 casos no se especifica el tipo de prótesis, de las cuales 5 son aórticas, 1 mitral; en las 3 restantes no se concreta tampoco la localización.

Dos pacientes presentaban enfermedades subyacentes (en ambos Diabetes mellitus).

El tiempo entre la implantación de la prótesis y la aparición de los síntomas osciló entre 3 semanas y 23 años: en 1 paciente este periodo fue  $\leq 1$  año, y en

8 mayor de 8 años. Se detectaron en 5 casos factores de riesgo, entre los cuales destacan por un lado la cirugía previa (en el caso de menor tiempo desde la implantación de la prótesis) y por otro lado las manipulaciones de la barrera cutáneo-mucosa (pinchazo o herida en dedo, acupuntura, y realización de ventana pericárdica para liberación de derrame). 1 caso había tenido una EI previa.

Las formas de presentación clínica incluyeron: fiebre (57%), asociada a síndrome constitucional (9,5%) y a síntomas neurológicos (19%); insuficiencia cardíaca congestiva (33%), síntomas neurológicos sin fiebre (14%); manifestaciones cutáneas (14%) (hemorragias en astilla, máculas) ; manifestaciones reumatológicas (9,5%) (artritis de tobillo, espondilodiscitis); la aparición de nuevo soplo (33%); disfunción protésica (9,5%) y sudoración sin fiebre (14%).

El retraso diagnóstico, en los casos que fue reportado, fue de <1 mes en 6, entre 1 y 12 meses en 2 y > 12 meses en 2 pacientes.

La exploración ecocardiográfica mostró vegetaciones en el 44% de los casos; otros hallazgos fueron la presencia de absceso (38%), insuficiencia valvular (22%) y dehiscencia periprotésica (16%). En el 16% de los casos se objetivó una progresión de las lesiones en ecocardiogramas consecutivos.

Diez pacientes recibieron sólo tratamiento antibiótico (27%) y los restantes 27 antibioterapia más cirugía.

Los hallazgos macroscópicos encontrados en el momento del recambio

valvular se describen en 12 casos: absceso perivalvular 7 (58%), desinserción del anillo valvular 4 (33%), vegetaciones 3 (25%), destrucción de la raíz aórtica 1 (8%), y datos sugerentes de endocarditis (sin más especificación) 2 (16%). En uno de los casos este aspecto está especialmente detallado, describiendo la presencia de desinserción de la mitad del anillo protésico, junto con material friable y suturas desechas, sin datos típicos de endocarditis <sup>(35)</sup>.

Los datos histológicos son escasos y reportados únicamente en 8 casos: se describe la presencia de bacterias en el 75%, con identificación de bacilos gram positivos mediante tinción de Gram en el 25% de ellos. El 62% describe únicamente la presencia de datos compatibles con EI, sin más especificación.

Los antibióticos utilizados fueron penicilinas en monoterapia (22%) o en combinación con otros antibióticos (27%). Se describe la utilización de  $\beta$ -lactámicos (sin especificar cual) en 7 casos (31%), de los que el 9% se empleó en monoterapia y el 22% en terapia combinada con otros antibióticos. Otros tratamientos utilizados fueron vancomicina (13%) en tratamiento combinado con aminoglucósidos (4,5%) u otros antibióticos (9%). En un caso <sup>(34)</sup>, la aparición de un rash alérgico en relación con el tratamiento con penicilina G motivó el cambio a daptomicina.

Tres pacientes recayeron, uno de ellos hasta en cuatro ocasiones <sup>(37)</sup>. Dos de ellos habían sido tratados únicamente con antibioterapia. El tercero fue tratado con recambio valvular y tratamiento con vancomicina-pefloxacino. El tiempo hasta la recaída es de 5 meses y 10 meses, respectivamente en los dos casos que lo reportan, y los síntomas en ellos fueron síndrome constitucional en 1 y

fiebre, espondilodiscitis y hemorragias en astilla en 1, datos que no habían aparecido en los primeros episodios.

8 pacientes fallecieron a consecuencia de la EIVPPA, lo que supone una mortalidad del 22%.

## **B. DESCRIPCION DE LOS CASOS PUBLICADOS DE EI NATIVA POR *PROPIONIBACTERIUM ACNES***

En total son 19 los casos publicados de EI nativa por *PA* en la literatura.  
(5,7,8,13,19,23,24,25,30,32,33,37).

La edad media de los pacientes fue de 42 años (rango 1-70, mediana 42).

Once pacientes eran hombres y 8 mujeres. La localización de la endocarditis fue mitral en 6 casos, aórtica 5, doble afectación aorticomitral 2, y asentó sobre malformación congénita en 3 casos. En 3 casos no se especifica la localización de la EI.

Cuatro pacientes presentaban enfermedades subyacentes, dos diabetes mellitas y 2 EPOC. Uno de los pacientes diabéticos estaba además inmunosuprimido por haber sufrido un trasplante hepático 2 años antes.

Se encontraron factores de riesgo en 8 pacientes: 3 de ellos fueron infecciones otorrinolaringológicas recurrentes (otitis, amigdalitis y sinusitis de repetición), 3 tenían relación con alguna manipulación de la barrera cutánea (escara en talón, by pass femoropoplíteo y cirugía hepática de trasplante), 1 sufría una neumopatía crónica y 1 había tenido una EI previa por *Estreptococo*.

Las formas de presentación clínica fueron: fiebre (62.5%), nuevo soplo (50%), insuficiencia cardíaca congestiva (43.7%), síntomas neurológicos (6.2%), síntomas reumatológicos (6.2%), síntomas cutáneos (6.2%), síndrome constitucional (6.2%), embolismos periféricos (6.2%) y deterioro de la función renal (6.2%). Hay que destacar que esta última manifestación clínica no ha sido nunca descrita en las EIVPPA.

El retraso diagnóstico, en los casos que fue reportado, fue de <1 mes en 4, entre 1 y 12 meses en 5.

La exploración ecocardiográfica mostró insuficiencia valvular en el 53%, estenosis valvular (20%), presencia de vegetaciones (40%), y abscesos (33.3%). En 4 casos no se especifican los hallazgos ecocardiográficos.

Catorce pacientes (73.7%) recibieron tratamiento con antibioterapia más cirugía, los 5 restantes sólo recibieron tratamiento antibiótico.

Los hallazgos macroscópicos están especificados únicamente en 4 publicaciones, describiéndose la presencia de abscesos en 2, vegetaciones en 2 y en 1 fibrosis del aparato valvular y subvalvular.

En 6 publicaciones se hace mención a la histología de las válvulas, pero sólo 3 especifican los hallazgos, dos de ellas de forma muy exhaustiva <sup>(5,24)</sup>: en uno se describe la presencia de proliferación fibroblástica, necrosis fibrinoide y neovascularización, mientras que en otro destacan la presencia de vegetaciones friables, degeneración mixoide del tejido conectivo, y tejido de

granulación, entre otros. En 3 se describe únicamente la presencia de datos sugerentes de endocarditis.

Los antibióticos más utilizados fueron penicilinas en combinación con otros antibióticos (27%) o en monoterapia (9%), y vancomicina en combinación con aminoglucósidos (36%). Clindamicina fue empleado en 1 caso (9%). En dos casos se empleo beta-lactámico sólo o en combinación sin especificar el tipo de antibiótico (18%).

No hay descrita ninguna recaída en los pacientes con El sobre válvula nativa. La mortalidad de este grupo de pacientes es del 0%.

### 1.3. NUEVOS CONCEPTOS EN LA PATOGÉNESIS DE LA ENDOCARDITIS PROTÉSICA

#### 1.3.1. LA BIOCAPA

##### 1.3.1.1. GENERALIDADES

Una de las características principales del *PA* es su tendencia a infectar y persistir en aquellos sitios donde existe material protésico, como prótesis articulares <sup>(68-71)</sup>. Ya se especificó en el apartado anterior que 69% de las EI por *PA* descritas en la literatura sentó sobre dispositivos intracardiacos, siendo el 84% de ellos válvulas protésicas. Esta especial característica podría ser consecuencia de su capacidad de adhesión y de formar biocapa <sup>(72,73)</sup>.

La capacidad de formar biocapa, por parte de las bacterias, es una característica que en los últimos años está siendo estudiada exhaustivamente, Actualmente asistimos a una verdadera explosión de información sobre la biocapa y su importancia como mecanismo patogénico en la infección. Es significativo, valga de ejemplo, que tras la introducción del término anglosajón “*biofilm*” en la base de datos de Pubmed se consiguen un total de 12309 publicaciones. Y es que se ha estimado que la biocapa está presente hasta en un 65% de las infecciones tratadas por los clínicos en el mundo desarrollado <sup>(72)</sup>.



Este fenómeno se conoce desde el siglo XVII, cuando Van Leeuwenhoek describió los “animáculos” en la placa dental. Posteriormente, ganó en importancia desde la primera definición realizada por Marshall, en 1976, el cual la describió como “una capa muy fina de polímeros extracelulares”. Desde entonces dicha definición ha sufrido numerosas variaciones, a medida que se han ido descubriendo sus características. Actualmente la biocapa se define como una comunidad sesil derivada de microorganismos y caracterizada por células irreversiblemente adheridas a una superficie o entre ellas, y que están embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas mismas producen, y muestran un fenotipo alterado en cuanto a su tasa de replicación y expresión de genes <sup>(74)</sup>.

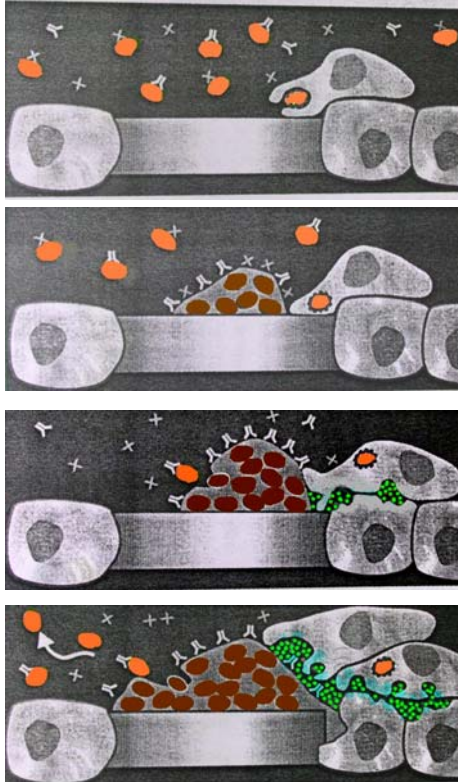
La biocapa viva está compuesta por tanto de células y matriz extracelular. Las primeras representan un 15% de toda la superficie, y se disponen en torres o “mushrooms” embebidas dentro de la matriz, que supone el restante 85%. Entre ellas existen canales por los que circula un flujo convectivo de agua. En esta comunidad heterogénea, de compleja estructura, los microorganismos conviven, cooperan y se comunican por sistemas de señales (*quorum sensing*) que dirigen el fenotipo y regulan una expresión de genes que nunca se expresan en las formas planctónicas. Allí resisten a los antibióticos, al estrés ambiental y a las defensas del huésped. Esta estructura básica es universal para todos los tipos de biocapa, con pequeñas variaciones.

Una de sus características, que es de gran importancia a la hora de entender la historia natural de las infecciones crónicas, es la posibilidad de que pequeñas

microcolonias de bacterias sesiles embebidas en la biocapa, sometidas a tensión, puedan romperse o desadherirse, convirtiéndose en bacterias planctónicas provocando émbolos sépticos a nivel capilar, y la consiguiente reagudización de los síntomas y signos infecciosos.

Las infecciones por biocapa comparten características clínicas: se desarrollan preferentemente sobre superficies inertes o tejido desvitalizado, tienen un crecimiento lento, sin producir síntomas infecciosos llamativos, pero su presencia estimula la producción de anticuerpos (**ver Figura 1**) y activan a los macrófagos, los cuales son incapaces de eliminar las bacterias sesiles, pero ocasionan un importante daño al tejido adyacente <sup>(72)</sup>. Por otro lado, los antibióticos eliminan las bacterias planctónicas y los síntomas causados por ellas, pero son incapaces de atacar a las bacterias sesiles, por lo que estas infecciones muestran frecuentes recaídas tras ciclos de antibióticos, y precisan habitualmente la retirada del material donde asienta esta biocapa para erradicar la infección.

La biocapa está presente en un enorme número de infecciones bacterianas, que incluyen, entre otras: la caries dental (biocapa producida por *Streptococcus*), las infecciones del tracto biliar (bacterias entéricas como *E. Coli*), las prostatitis (Gram negativos), la neumonía en la fibrosis quística (*Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*) y, por supuesto, una gran parte de las infecciones que asientan sobre material protésico, como suturas, shunts, catéteres o válvulas protésicas (con *S. epidermidis* y *S. aureus* como principales patógenos) o sondas urinarias (Gram negativos) <sup>(72)</sup>.



Las bacterias planctónicas (**naranjas**) pueden ser eliminadas por los macrófagos y los anticuerpos y son susceptibles a los antibióticos (**aspas**).

Las bacterias se adhieren a la superficie, forman biocapas y se transforman en formas sesiles (**marrones**), resistentes a la fagocitosis, a los antibióticos y a los anticuerpos.

Los macrófagos son atraídos por la biocapa, pero la fagocitosis no puede acabar con ella, a pesar de la liberación de enzimas al espacio intercelular (**verde**)

Estas enzimas producen daño tisular en los tejidos adyacentes a la biocapa; mientras, bacterias planctónicas siguen siendo liberadas desde la biocapa.

(Tomado de Costerton: *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science. 1999<sup>(72)</sup>)

**FIGURA 1: LA BIOCAPA Y SU INTERACCIÓN CON EL SISTEMA INMUNE**

Se han propuesto 4 criterios para calificar a una biocapa como agente etiológico de una infección<sup>(75)</sup>:

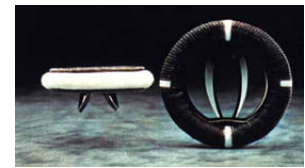
1. La bacteria patógena ha de estar asociada a una superficie o adherida a un sustrato.
2. El examen directo debe mostrar las bacterias en acúmulos, incrustadas en una matriz propia o formada por componentes del huésped.
3. La infección ha de ser localizada.
4. La infección se debe mostrar resistente a los antibióticos pese a la sensibilidad de las formas planctónicas del microorganismo identificado.

A la hora de estudiar la formación de biocapa in vitro se han empleado distintos aparatos y dispositivos, capaces de crear unas condiciones similares a las

fisiológicas en cuanto a flujo o temperatura, como son el Calgary Biofilm Device, el Disk Reactor o el CDC Biofilm Reactor <sup>(74)</sup>. Otros, como Tunney, han demostrado la formación de biocapa en sistemas “estáticos” como placas multipocillo <sup>(76)</sup>. Ha sido en estos modelos estáticos en los que se ha basado el presente trabajo.

Se desconoce si la capacidad de formar biocapa tiene relación no sólo con la bacteria en cuestión, sino también con el sustrato sobre el cual se forma. Las válvulas protésicas cardíacas más utilizadas en los últimos años son: Sorin, St Jude y Carbomédics. Atendiendo a la diferente composición de cada modelo, podría hipotetizarse que exista una diferente tendencia de las bacterias a adherirse a su superficie. La composición de las 3 válvulas es la siguiente:

- ♦ Sorin: Jaula de titanio de espesor fino, cubierta de *Carbofilm*, y dos valvas de carbón pirolítico impregnadas de tungsteno, sobre núcleo de grafito radioopaco



- ♦ St Jude: Entramado de titanio con capa de carbón pirolítico



- ♦ Carbomédics: Variante de St Jude, de la misma composición que ésta.



El carbón pirolítico es grafito bombardeado con átomos de carbón a muy altas temperaturas, convirtiéndose en un material casi tan duro como el diamante. Estas prótesis comienzan a presentar desgaste después de un equivalente a

80 años de funcionamiento. Además de por su dureza y durabilidad, este material se utiliza en prótesis cardíacas porque es muy poco trombogénico. Durante los últimos años ha sido el material de elección para la fabricación de prótesis valvulares. Las válvulas de la marca Sorin van recubiertas por un nuevo material, el denominado *Carbofilm*, que se describe como una fina cubierta (0,5  $\mu\text{m}$  de espesor) de carbón de alta densidad que se deposita sobre la superficie a tratar mediante vapor, sin alterar la estructura subyacente. Se ha demostrado, en estudios experimentales animales, que dicha cubierta previene la respuesta inflamatoria aguda precoz secundaria a la implantación del dispositivo, y que inhibe la reacción de cuerpo extraño resultante de la interacción entre los tejidos y el material implantado. Asimismo previene con mayor eficacia que otros materiales la formación de trombos y mejora la pseudoendotelización de las superficies.

También se desconoce si la presencia de teflón determina una mayor cantidad de biocapa, lo que podría significar una mayor facilidad para el desarrollo de la biocapa.

### 1.3.1.2.. LA BIOCAPA DEL *PROPIONIBACTERIUM ACNES*

La biocapa del *PA* está aún poco estudiada y, haciendo la comparativa con el ejemplo de la búsqueda en Pubmed hecho con el término anglosajón “*biofilm*”, tras introducir los términos “*Propionibacterium acnes biofilm*” la búsqueda se limita únicamente a 33 referencias.

Se ha estudiado en el acné <sup>(77)</sup>, en infecciones protésicas articulares <sup>(69,70)</sup>, en shunts ventriculoperitoneales <sup>(78)</sup>, en catéteres <sup>(79)</sup>, en la endoftalmitis postimplantación de lente intraocular <sup>(51)</sup> y en tejido prostático de pacientes con hiperplasia benigna de próstata o cáncer de próstata <sup>(80)</sup>. Existen además en la literatura trabajos que muestran in vitro la capacidad del *PA* de formar biocapa sobre biomateriales <sup>(55, 76, 78, 81)</sup>. Sin embargo existe un estudio que rebate la capacidad del *PA* de formar biocapa sobre un material de relleno de las raíces dentarias llamado Gutta-Percha <sup>(82)</sup>, aunque esto no ha sido confirmado por otros autores posteriormente.

No obstante, la publicación reciente de la secuencia genómica del *PA* ha demostrado que este microorganismo tiene 3 parejas de genes separados que codifican enzimas involucrados en la biosíntesis del polisacárido extracelular, sugiriendo por tanto la capacidad de formar biocapa <sup>(83, 84)</sup>. Concretamente, estos genes están involucrados en la producción de distintos polisacáridos y lipoglicanos: N-acetil-D-manosaminurato dehidrogenasa, UDP-N-acetilglucosamina-2-epimerasa, manosa 1-fosfato guanililtransferasa y Exo a (una proteína encargada de la biosíntesis de succinoglicano) <sup>(85)</sup>. Asimismo, se

ha descrito la existencia de una proteína fijadora de fibronectina en la superficie bacteriana del *PA*, la cual podría ser la responsable de su capacidad para adherirse a distintos biomateriales <sup>(86)</sup>.

Sin embargo no existen datos en la literatura sobre la existencia de biocapa en prótesis valvulares cardíacas infectadas por este microorganismo. Su presencia explicaría en parte el mecanismo del daño que sufre el tejido periprotésico en esta enfermedad. Por otro lado, la presencia de biocapa también justificaría el que cultivos rutinarios de las prótesis cardíacas no identificaran la presencia del microorganismo, al no conseguir el crecimiento de las bacterias sesiles embebidas en ella. Para aumentar el rendimiento de los cultivos en el material protésico se han recomendado técnicas como la sonicación. Existen varios artículos que demuestran que este procedimiento es imprescindible a la hora de evaluar las infecciones protésicas articulares, ya que aumenta la tasa de detección bacteriana <sup>(70, 87, 88)</sup>, gracias a la separación de las colonias adheridas al material protésico. En concreto, ha sido la identificación de la presencia de *PA* la que más se ha beneficiado de dicha técnica, aumentando, según Tunney y cols la tasa de prevalencia de infección protésica articular por *PA* a valores casi similares a la de los estafilococos <sup>(69)</sup>.

La reciente publicación de un estudio en el que se demuestra que el *PA* es el segundo microorganismo encontrado con más frecuencia como colonizador de catéteres intravasculares después de *Staphylococcus sp* sugiere asimismo esta capacidad <sup>(89)</sup>.

### 1.3.1.3. VISUALIZACIÓN DE LA BIOCAPA

El desarrollo de la microscopía ha permitido el avance en el conocimiento de la biocapa. Inicialmente fue el microscopio electrónico óptico de barrido (MOB) el que primero sirvió para su descripción, pero dicha técnica tenía la dificultad de requerir la deshidratación de las muestras, hecho que provocaba una importante distorsión en la estructura de la biocapa, compuesta en su mayoría por agua. El advenimiento de la microscopía láser confocal (MLC), con la que la muestra no necesita deshidratación para su observación, ha permitido un conocimiento aún más profundo, y ha clarificado las bases del concepto actual de biocapa <sup>(74)</sup>.

La MLC requiere el uso de sustancias fluorescentes para la visualización del material, las cuales tienen la propiedad de emitir luz cuando se las excita a determinadas longitudes de onda. Entre ellas se encuentran colorantes específicos de ácidos nucleicos como DAPI (diamidinofenilindol), naranja de acridina, y Syto 9; otros colorantes han sido desarrollados para demostrar la viabilidad de las células, como el yoduro de propidium o el kit “Live/Dead BacLight”. Todas estas tinciones servirían para la localización del microorganismo, al unirse específicamente a estructuras propias (ácidos nucleicos o pared celular). Dentro de este grupo de técnicas también se incluye la hibridación in situ fluorescente (FISH), que, mediante una sonda fluorescente identifica el material genético del microorganismo a estudio <sup>(90)</sup>. Asimismo, en los últimos años, la tinción con anticuerpos policlonales o monoclonales (AcMo) se ha desvelado como una técnica rápida y válida para el diagnóstico de



infecciones por biocapa<sup>(70)</sup>.

Por otro lado, se han empleado distintas tinciones con el propósito de identificar y caracterizar la matriz de exopolímeros que embebe las bacterias. Ejemplos de estas tinciones son las lectinas o el calcoflúor<sup>(91)</sup>. Esta última sustancia emite una coloración azulada en un amplio rango de excitación, entre 360 y 420 nm. Tiene la propiedad de unirse a polisacáridos, por ello ha sido utilizada para la tinción de la matriz polimérica de la biocapa, ya que, en la composición de ésta se encuentran habitualmente carbohidratos<sup>(74)</sup>.

Aunque dichas técnicas han sido ampliamente empleadas en distintos procesos y materiales, nunca han sido utilizadas para el estudio de la biocapa en prótesis cardíacas.

Las publicaciones que describen la biocapa producida por *PA* son muy heterogéneas en cuanto al método empleado para su visualización. Está descrita a través de tres métodos distintos:

1. Por su apariencia morfológica tras su visualización con microscopía óptica de barrido (MOB) y/o de transmisión:
  - sobre prótesis de cadera, describiendo que el “*PA* crece embebido en una capa que cubre la superficie de la prótesis” (Tunney 1998)<sup>(69)</sup>
  - sobre shunt ventriculoperitoneal, formando “hebras englobando

una capa de bacilos “ (Bayston 2007) <sup>(78)</sup>

- Sobre una lente intraocular, definida como “capa granulosa sobre la superficie de la lente explantada, con partículas difteroides de  $<1\ \mu\text{m}$  a lo largo de la superficie” (Lai 2006) <sup>(51)</sup>
- sobre catéteres, formando una “capa amorfa continua a lo largo del catéter, con bacterias en su interior” (Passerini 1987) <sup>(79)</sup>

2. Por su análisis cuantitativo mediante la medida de la biomasa total de bacterias:

- mediante el conteo de las UFC en placas (Coenye 2007) <sup>(55)</sup>
- medida por Radioluminiscencia (Bayston 2007) <sup>(78)</sup>

3. Por la apariencia morfológica de los agregados de bacterias, al ser teñidas con distintas técnicas:

- Con azul violeta y Resazurin (Coenye 2007) <sup>(55)</sup>
- Con Anticuerpos Monoclonales (AcMo) específicos para PA (Tunney 99) <sup>(70)</sup>
- Mediante Hibridación in situ fluorescente multicolor (Alexeyeb 2007) <sup>(80)</sup>.

En estos últimos artículos, como tal, no fue visualizada la matriz de exopolímeros, pero se asume su existencia por la apariencia de los agregados. En concreto, en el trabajo de Tunney <sup>(70)</sup>, que fue el primero utilizar los anticuerpos monoclonales en la visualización de la biocapa, se habla indistintamente de biocapa o de agregados bacterianos, y además puntualizan

que es el grosor de estos agregados el que hace diferenciar las bacterias formantes de la biocapa (que en su estudio presentan grosores de entre 3 y 4,5  $\mu\text{m}$ ) de las que son meramente contaminantes, que se muestran aisladas unas de otras.

### 1.3.2 LA ANGIOGÉNESIS Y LOS POLIMORFISMOS DE VEGF

La angiogénesis es un proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes, y que ocurre normalmente durante el desarrollo embrionario, el crecimiento y la cicatrización, pero además tiene un papel fundamental en el crecimiento de los tumores. También se ha descrito como mecanismo fisiopatológico acompañante a distintos procesos inflamatorios e infecciosos. Estas situaciones tienen en común el que en ellas se produce una secreción de varios factores de crecimiento, siendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*) el más importante de ellos. El VEGF está implicado en el desencadenamiento de procesos inflamatorios, ya que provoca extravasación vascular y movilización de leucocitos, con una relación clara entre su expresión y el grado de inflamación.

La relación entre expresión de VEGF y respuesta inflamatoria parece demostrada en el caso de trastornos de origen inflamatorio o autoinmune. Se ha evidenciado su sobreexpresión en enfermedades como artritis reumatoide, síndrome POEMS, psoriasis, espondilitis anquilopoyética, esclerosis múltiple,

diabetes, demencia y otras enfermedades vasculares cerebrales, vasculitis, numerosos tipos de cáncer, retinopatía, endometriosis, aterosclerosis, pancreatitis crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, aborto recurrente, preeclampsia o litiasis.

La angiogénesis se ha postulado, además, como uno de los responsables del daño en las válvulas cardíacas o en el tejido periprotésico valvular en situaciones de infección <sup>(92)</sup>. Recientemente se ha descrito que el déficit de un factor antiangiogénico, la condromodulina-I, se asocia a mayor expresión del VEGF y de las metaloproteasas, y consecuentemente, con lesiones vasculares ateroscleróticas, reumáticas o infecciosas <sup>(93)</sup>.

La explicación de por qué el VEGF se expresa de manera distinta en unos individuos o en otros podría residir en la existencia de polimorfismos en el gen de este factor de crecimiento, que parecen regular tanto su expresión como la vascularización.

Un polimorfismo genético es una variante alélica que existe de forma estable en una población, y para ser considerado como tal debe presentar una frecuencia de al menos el 1%. Son, por lo tanto, diferentes de las mutaciones, que son mucho menos frecuentes. En los últimos años estamos asistiendo a un importante desarrollo de este campo de la inmunohistopatología, y cada vez más aparecen publicaciones en relación con polimorfismos de todo tipo de genes; en el campo de las infecciones hay que destacar el trabajo de Garnacho y cols <sup>(94)</sup> en el que describen los distintos polimorfismos de interleuquinas que están asociados a una diferente evolución de la sepsis y el shock séptico.

El tipo de polimorfismo de VEGF, por tanto, podría determinar una mayor o menor expresión del mismo, y por tanto, una distinta reacción angiogénica, y por ende, antiinflamatoria, en respuesta a la enfermedad.

Existen 4 polimorfismos del gen VEGF considerados como los más importantes. En población normal, el genotipo normal o “wild type” para cada polimorfismo es: 2587 A/A, 1154 G/G, 634 G/G y 936 C/C. El estudio genético se hace preferentemente por PCR-RFLP, y la expresión por inmunohistoquímica.

### 1.3.3 LA METALOSIS

La metalosis es una reacción química y tóxica provocada a largo plazo por el contacto de un dispositivo metálico con el tejido circundante, pudiendo causar un importante daño en el mismo, incluso si se trata de hueso. Morfológicamente se identifica como un material negrozco producto de la acumulación de partículas liberadas desde el material metálico cercano. Ha sido descrito en prótesis articulares, como hallazgo tardío tras la introducción de un cuerpo extraño metálico en el ojo <sup>(95)</sup>, o tras la instrumentación en la cirugía vertebral <sup>(96)</sup>. El hallazgo de metalosis en el tejido periprotésico de alguno de los pacientes de este trabajo hace indispensable la revisión de su significado.

La presencia de éstas partículas metálicas, fruto de la degradación del material metálico, puede ocasionar procesos corrosivos y desinserciones (o

aflojamientos, en el caso de las articulaciones) protésicas, mediante la producción de osteolisis periprotésica <sup>(97-99)</sup>.

Se piensa que los mecanismos responsables de dicha reacción pudieran ser inmunológicos <sup>(100)</sup>, por una posible hipersensibilidad al metal, basando esta suposición en el hallazgo de un importante infiltrado linfoplasmocitario, así como en los importantes grados de metalosis encontrados en los tejidos periprotésicos obtenidos de pacientes con prótesis de cadera explantadas por aflojamiento aséptico <sup>(99)</sup>. Aunque no es descartable que la presencia de microorganismos juegue también un papel en la degradación del metal protésico, en ninguna publicación se ha asociado claramente la presencia de metalosis con infección a nivel local.

En la literatura no hay descrito ningún caso de metalosis en el tejido periprotésico de pacientes con endocarditis protésicas, ni tampoco hay referencias que relacionen el *Propionibacterium* con la degradación del metal. Sin embargo, existe la posibilidad teórica de que el PA pudiera ser capaz de degradar el metal, ya que secreta ácido propiónico, que tiene la capacidad, en presencia de agua y a ciertas temperaturas, de ser corrosivo para ciertos metales <sup>(101)</sup>. Esta hipótesis no ha sido estudiada en material protésico clínico.

#### 1.4. PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENDOCARDITIS NO BASADOS EN CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS

Los cultivos convencionales pueden infraestimar las infecciones, concretamente las de curso crónico y escasa expresión clínica, en las que probablemente la biocapa juegue un papel importante. Existen actualmente técnicas independientes de los cultivos, que pueden demostrar la presencia de microorganismos en material protésico <sup>(102)</sup>. Estos métodos tienen la ventaja de acortar el tiempo de procesamiento de las muestras, facilitando un diagnóstico más precoz. Otra ventaja es que son capaces de detectar bacterias que, siendo viables, son incapaces de crecer en los medios de cultivo: por su difícil crecimiento, por la presencia de un inóculo pequeño, por la exposición previa a antibióticos, o por encontrarse embebidas dentro de la biocapa en un estado de “quiescencia”.

Entre estas técnicas se encuentran fundamentalmente la PCR y la inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales.

#### 1.4.1 LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA ENDOCARDITIS: EL DIAGNÓSTICO POR PCR

Durante los últimos 10 años, la utilización de la PCR en válvulas de pacientes con EI ha mejorado el diagnóstico etiológico de las mismas, especialmente en los casos de endocarditis con cultivo negativo debido a una antibioterapia reciente, y en las endocarditis producidas por microorganismos de difícil crecimiento <sup>(103)</sup>. La PCR ha resultado positiva en hasta un 39% de las muestras con cultivo negativo <sup>(104)</sup>. Hay publicaciones que han sugerido incluso incluirla como un criterio mayor adicional dentro de la clasificación de Duke <sup>(105)</sup> debido a la alta correlación entre los casos definidos como definitivos o probables y los casos positivos por PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) es un método muy sensible y capaz de detectar ADN de la bacteria a partir de cualquier muestra. Permite obtener los resultados de múltiples muestras en breve tiempo, al realizar simultáneamente la amplificación y detección del producto.

Se pueden usar dos métodos diferentes de amplificación: las sondas FRET y colorantes como SYBR-Green. La PCR con sistemas de sondas FRET (*fluorescent resonant energy transfer*) es un método específico de detección, pero tiene la desventaja de su mayor coste y manipulación. Los colorantes de cadena doble (SYBR-Green) permiten la detección del ADN de cadena doble generado durante la reacción de PCR. La fluorescencia aumenta al ser doble cadena, pero no debe interferir ni inhibir la reacción. La PCR revelada con



SYBR-Green como método de amplificación aporta mayor sensibilidad pero menor especificidad que la que aporta la amplificación con sondas FRET.

Los inconvenientes de la PCR incluyen: un mayor coste económico, la posibilidad de detectar bacterias contaminantes que compliquen la interpretación de resultados en el caso de usar sondas de detección universal, o de ADN bacteriano de antiguas endocarditis, en los casos de reinfección. Por todo ellos, los datos obtenidos por PCR han de cotejarse estrechamente con los obtenidos por los cultivos microbiológicos y los estudios anatomopatológicos <sup>(103)</sup>.

Hay 3 artículos en la literatura en los que se describe la PCR como arma diagnóstica en 3 casos de endocarditis por *Propionibacterium acnes*; en el primero se realizó en sangre, para confirmar el resultado de varios hemocultivos positivos para *P. acnes* <sup>(31)</sup>, y en los otros tres se realizó sobre muestras quirúrgicas <sup>(32,40)</sup>; en dos de estos casos el cultivo había resultado estéril.

1.4.2. LA INMUNOLOGÍA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN:  
IMUNOFLUORESCENCIA Y ANTICUERPOS MONOCLONALES (ACMO)

Tunney y Patrick han desarrollado técnicas de inmunofluorescencia para la detección de microorganismos en prótesis de cadera extirpadas por sospecha de infección <sup>(70)</sup>. Empleando la sonicación para despegar la biocapa de la prótesis, y tras la incubación de las muestras junto con ACMO o antisueros policlonales específicos para ciertos microorganismos, han sido capaces de detectar bacterias hasta en un 53% de las muestras que arrojaban un resultado negativo tras los cultivos microbiológicos habituales.

Esta técnica tiene una serie de ventajas adicionales frente a la PCR, entre las que destaca fundamentalmente el tiempo total de procesamiento, mucho más corto que el de la PCR (3 horas frente a las 13 horas que requiere la PCR) y por supuesto el del cultivo habitual. Esta técnica permitiría al clínico, prácticamente en el mismo día de la extracción de la prótesis, conocer si está infectada. Otras ventajas son la capacidad de distinguir entre contaminación e infección real, por el aspecto al microscopio de fluorescencia de los agregados bacterianos, como ya se ha comentado. Asimismo, la inmufluorescencia es una técnica fácilmente reproducible por personal no experto y relativamente barata, pudiéndose realizar cómodamente en cualquier laboratorio.

La potencial limitación de esta técnica es que se han de emplear anticuerpos específicos frente a las bacterias que se quiere estudiar, siendo por tanto incapaz de detectar el resto de bacterias <sup>(102)</sup>.

Otros autores, como Liang y Raoult, han utilizado anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de endocarditis nativas por otros microorganismos, con buenos resultados <sup>(106)</sup>.

Esta técnica no ha sido, hasta la fecha, desarrollada en prótesis valvulares cardiacas.

**HIPÓTESIS**

---

## HIPÓTESIS

La endocarditis infecciosa sobre válvula protésica por *Propionibacterium acnes* (EIVPPA) se comporta como una enfermedad crónica debido a ciertos mecanismos fisiopatológicos.

# OBJETIVOS

---

## **PRIMARIOS**

1. Describir las características epidemiológicas, clínicas, ecocardiográficas, microbiológicas, macroscópicas y anatomopatológicas de la EIVPPA.
2. Determinar los mecanismos fisiopatológicos que pueden influir en las características de la EIVPPA
  - a. Producir *in vitro* la biocapa por *Propionibacterium acnes* sobre válvulas protésicas cardíacas
  - b. Determinar el biotipo de las distintas cepas de *Propionibacterium acnes* productoras de los casos de EIVPPA.
  - c. Detectar el tipo de polimorfismo predominante del gen VGEF en los pacientes con EIVPPA.

## **SECUNDARIOS**

1. Determinar si el *Propionibacterium* se adhiere con mayor facilidad a unas prótesis o a otras, en función de su diferente composición, y si muestra mayor predisposición a la adherencia en presencia de teflón
2. Evaluar la validez de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR) en el diagnóstico de la EIVPPA.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **4.1. INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

### **4.1.1. DEFINICIONES:**

- RETRASO DIAGNÓSTICO: Tiempo transcurrido desde la aparición del primer síntoma hasta el diagnóstico.
- FORMA DE PRESENTACION: Primeros síntomas y/o signos con los que se presentó el paciente a la primera consulta, sean o no la que corresponde al ingreso.

### **4.1.2. PACIENTES**

Se recogieron de forma prospectiva, consecutiva y concurrente 16 casos definitivos de EIVPPA (14 diagnosticados en nuestro centro) entre 1991 y 2006, a través de un cuestionario con variables definidas. Constituyeron el 4,3% de las endocarditis diagnosticadas en nuestro centro en ese periodo. En 9 la endocarditis fue sospechada por el cirujano en el acto quirúrgico y, en todos, la histología fue compatible con endocarditis y el cultivo, positivo para *PA*. Con el fin de describir los aspectos evolutivos de la enfermedad los datos se describen agrupados en tres periodos: desde el inicio de los síntomas hasta el

diagnostico, en el ingreso diagnostico, y hasta finalizar el seguimiento (hasta 5 años; mediana, 3 años)

El Hospital de La Princesa es un centro de tercer nivel de la Comunidad de Madrid y centro de referencia de Cirugía Cardíaca; atiende a una población de aproximadamente 400000 personas, y dispone de 700 camas de hospitalización.

### **4.1.3.- DATOS**

#### **4.1.3.1. EPIDEMIOLÓGICOS**

Enfermedades subyacentes, factores predisponentes (posibles focos que pudieran servir de puerta de entrada del microorganismo), tipo y fecha de implantación de la prótesis valvular y presencia de otros materiales protésicos.

#### **4.1.3.2. CLÍNICOS**

Tiempo entre la colocación de la prótesis y aparición de los síntomas, retraso diagnóstico, forma de presentación, síntomas durante el periodo sintomático previo al diagnóstico, ingresos previos durante el periodo sintomático, síntomas al ingreso y en las recaídas.

#### **4.1.3.3. ECOCARDIOGRÁFICOS**

Hallazgos en los ecocardiogramas realizados durante los 3 periodos descritos: presencia de vegetaciones, abscesos, pseudoaneurismas, dehiscencia, insuficiencia o estenosis valvular.

#### **4.1.3.4. MICROBIOLÓGICOS**

Número de hemocultivos extraídos al ingreso, tasa de positividad de los cultivos de sangre y de las muestras quirúrgicas, determinación del tiempo de incubación hasta el crecimiento en ambos casos.

#### **4.1.3.5. TERAPEÚTICOS**

Tipo y duración del antibiótico administrado. Indicación y cumplimiento del tratamiento oral supresor. Evolución tras el tratamiento antibiótico y/o quirúrgico, complicaciones precoces y tardías

### **4.1.4.- PROCEDIMIENTOS**

#### **4.1.4.1 CLÍNICOS**

Se realizó al ingreso historia clínica y exploración, junto a las pruebas complementarias correspondientes. Se realizó seguimiento tras el alta en 9 pacientes (mediana 3 años, rango 1 día-5 años)

#### **4.1.4.2. ECOCARDIOGRÁFICOS**

Se realizó ecocardiograma transtorácico y transesofágico al ingreso y se repitió durante el mismo si estaba indicado. En los pacientes en los que no se sospechó endocarditis protésica antes de la cirugía se realizó ecocardiograma transtorácico y cateterismo.

#### **4.1.4.3. MICROBIOLÓGICOS**

##### **4.1.4.3.1.- CULTIVOS**

Se obtuvieron al menos 3 hemocultivos (aerobios y anerobios) al ingreso en los casos en que se sospechó EI. Se incubaron en el sistema Bactec 9240 (Becton Dickinson). Cuando se detectaban indicios de crecimiento se realizaba tinción de Gram del material y subcultivo en placas de agar sangre, agar chocolate y cultivo anaeróbico. Se reincubaron los hemocultivos en los que no se detectaba crecimiento hasta completar 30 días.

Se cultivaron todas las muestras quirúrgicas, tanto valvulares como material o tejido periprotésico. El procesamiento de las muestras quirúrgicas se realizó de la siguiente forma:

- Impronta sobre placa de agar sangre y tinción de Gram de la misma
- Trituración del tejido en mortero y siembra directa del material obtenido en agar sangre, agar chocolate y cultivo de anaerobios, que se analizó a las 48 horas
- Incubación en frascos de hemocultivos para aerobios y anaerobios, y procesamiento según proceso descrito anteriormente.
- Incubación en medios de enriquecimiento (tioglicolato) durante 30 días
- Incubación de tioglicolato en el frasco de envío de la muestra, que se analizó cada 7 días hasta completar 30 días.

**4.1.4.3.2. DETECCION DE P. ACNES MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL  
(RT-PCR)**

Se realizó la RT-PCR para la detección del ADN del PA en 12 pacientes; en 9 de ellos se realizó de muestras de tejido fijado en parafina, que se encontraban archivadas desde su diagnóstico, en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de La Princesa. En algunos de los casos se tomaron muestras de distintas partes del tejido.

En 3 pacientes dicho procedimiento se realizó directamente sobre tejido obtenido en fresco. En uno de los casos se realizó tanto en el tejido periprotésico como en el trombo que se encontró adherido a una de los discos protésicos; en los otros dos casos se realizó únicamente en el material periprotésico, del que se analizaron varias muestras provenientes de distintas áreas del anillo. En el paciente 16 las muestras provenían del segundo recambio valvular por la recaída de su endocarditis.

- A. Procedimiento de extracción de ADN de material en parafina:
  1. Disponer las muestras en parafina en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
  2. Añadir entre 50 y 300 µL de Buffer de digestión (Tris 0.05 M y pH 8.5) en cada Eppendorf en función de la cantidad de muestra.
  3. Agitar en el vórtex y calentar en placa a 100°C durante 10-20 min.
  4. Dejar enfriar a temperatura ambiente
  5. Añadir proteinasa K (20mg/mL): 2µL de pt K cada 100µL de buffer.

6. Mantener durante una noche a 55°C para conseguir la lisis completa del tejido.
7. Al día siguiente añadir Chelex (ácido aminodiacético) al 5%: 10µL por cada 100µL de muestra, y se deja actuar 30 min a 55°C
8. Calentar a 100°C unos 10 min, para inhibir la pt K.
9. Tras centrifugar durante 15 min a temperatura ambiente, pipetear el contenido, menos el tapón de parafina.
10. Resuspender el ADN en un nuevo tubo eppendorf.

- B. Procedimiento de extracción de ADN de tejido en fresco

Para este procedimiento se utilizó el kit *Puregene* (R&D) para muestras en fresco:

- Disponer 10 mg de tejido en un tubo junto con 600 µl de Cell Lysis Solution.
- Homogeneizar el material lo más posible con ayuda de un mortero.
- Tras añadir 3 µl de Proteinase K Solution, incubar durante toda la noche a 55°C.
- Añadir 3 µl de RNase A Solution a la muestra y tras invertir 25 veces, reincubar a 37°C durante 60 minutos.
- Añadir 100 µl de Protein Precipitation Solution a la muestra
- Vortexear durante 20 segundos.
- Centrifugar a 13,000 x g durante 5 minutos, tras lo que se obtiene el pellet de precipitado de proteínas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Extraer el sobrenadante, que contiene el ADN, y resuspender en nuevos tubos junto a 600 µl de Isopropanol.
- Centrifugar de nuevo durante 10 minutos a 13,000 x g rpm.
- Decantar el sobrenadante, sin perder el pellet de ADN
- Lavar con 300 µl de Etanol al 70% para blanquear la hebra y centrifugar durante 1 minuto a 13,000 x g rpm.
- Decantar el sobrenadante cuidadosamente y pasar la hebra de ADN a un eppendorf con 50 µl de DNA Hydration Solution.
- Reincubar la muestra durante 1 hora a 65 °C.

La cuantificación de la cantidad de ADN obtenido se realizó sólo en el caso de las muestras fijadas en parafina.

Una vez obtenido el ADN, se realizó ampliación genómica (Reacción en cadena de la Polimerasa), y secuenciación de ADN, para detectar la presencia de la secuencia genómica 16s rDNA correspondiente al *PA*, en tiempo real, con el LightCycler 1.0, y utilizando el Software versión 3.5 para Microsoft.

Para revelar la amplificación se usaron paralelamente sondas FRET (fluorescente resonante energy transfer) y SYBR-Green (colorante de cadena doble). Este último se decidió utilizar para aumentar la sensibilidad del procedimiento, debido a la escasa muestra de la que se disponía, y así aumentar las posibilidades de detección, aún a pesar de perder en especificidad. Como control positivo en ambas técnicas se utilizó la cepa 166794 proveniente del cepario, y perteneciente al caso del paciente nº 12. Como control negativo se empleó agua estéril.

**4.1.4.3.2.1. SONDAS FRET**

Un total de 2 µl del ADN extraído de las muestras se añadieron a 18 µl de mezcla de reacción con MgCl<sub>2</sub> (2 mM), 1 µM de cada primer (Forward 5'-GCG TGA GTG ACG GTA ATG GGT A - 3' y Reverse 5'-CAC TTC CGA CGC GAT CAA - 3' ) y 0.2 µM de las sondas marcadas con LC-Red 640 (5'- CTG GCA CGT AGT TAG CCG GTG CTT) y fluoresceína (5'- CAC CCT ACG TAT CAC CGC GGC T) (TIB MOLBIOL, Berlín, Alemania), junto con 2 µl de LightCyclerFastStart DNA Master Hybridation Probes (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania) completando un volumen total de 20 µl para cada capilar de reacción. Los capilares se alojan en el carrusel del LightCycler 1.0 Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Alemania) tras una breve centrifugación a 2000 rpm. El protocolo de amplificación fue el siguiente (**ver**

**Gráfico 1):**

- 5 minutos a 95°C de preincubación para la activación de la Fast Star taq DNA polimerasa
- 40 ciclos de:
  - o 10 segundos de desnaturalización a 95°C
  - o 10 segundos de hibridación a 50°C
  - o 10 segundos de elongación a 72°C.

Durante estos ciclos la fluorescencia se mide en modo single a 640 nm durante la fase de hibridación (50°C).

- 1 ciclo de 30 segundos para obtener la *melting curve*, con un ascenso constante de la temperatura a razón de 0.1°C/s, desde 40°C hasta 85°C, monitorizando la señal en modo continuo a 640 nm.



#### **4.1.4.3.2.2. SYBR-GREEN .**

La mezcla de reacción incluye:  $\text{MgCl}_2$  (2 mM); 1  $\mu\text{M}$  de cada primer y 2  $\mu\text{l}$  de LC- FastStart DNA Master SYBR-Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). A esta mezcla se le añaden 2  $\mu\text{l}$  del ADN obtenido en el proceso de extracción, completando un volumen total de 20  $\mu\text{l}$  para cada capilar de reacción. El protocolo de amplificación fue el siguiente (**ver Gráfico 2**):

- 5 minutos a 95°C de preincubación
- 50 ciclos de
  - o 10 segundos de desnaturalización a 95°C
  - o 10 segundos de hibridación a 50°C
  - o 17 segundos de elongación a 72°C.

Durante estos ciclos la fluorescencia se mide en modo single a 530 nm durante la fase de elongación (72°C).

- 1 ciclo de 30 segundos para obtener la *melting curve*, con un ascenso constante de la temperatura a razón de 0.1°C/s, desde 40°C hasta 85°C, monitorizando la señal en modo continuo a 530 nm.

## MATERIAL Y MÉTODOS

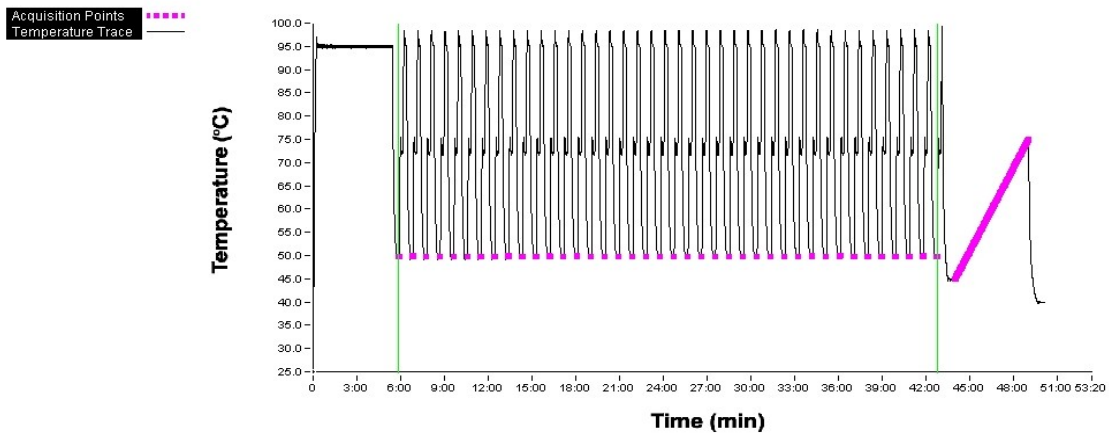


GRÁFICO 1: PROTOCOLO LIGHTCYCLER PARA SONDAS FRET

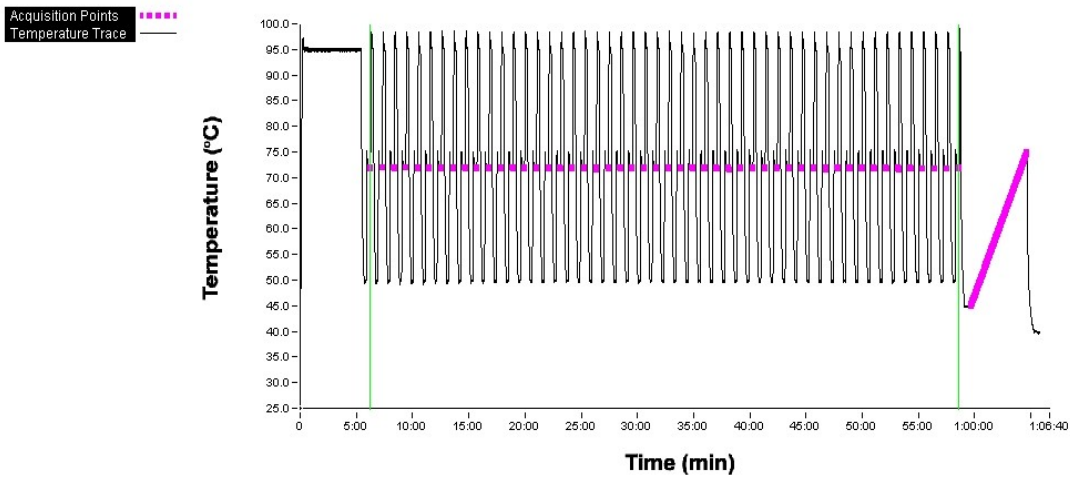


GRÁFICO 2: PROTOCOLO LIGHTCYCLER PARA SYBR-GREEN

#### **4.1.4.4. ANATOMOPATOLÓGICOS**

El aspecto macroscópico de las válvulas fue descrito por el cirujano en el momento del recambio valvular. Las muestras quirúrgicas, prótesis y tejido periprotésico se remitieron a microbiología, donde en condiciones de asepsia fueron valoradas por el patólogo. Las prótesis y una porción de las vegetaciones y del tejido periprotésico se procesaron para cultivo. Parte del tejido periprotésico y de las vegetaciones, así como el pannus, se enviaron para estudio histológico.

El análisis histológico del tejido periprotésico de los 14 casos diagnosticados en el Hospital de La Princesa se realizó según procedimiento rutinario, en los días sucesivos a la extracción, con la descripción de las muestras previamente fijadas en parafina y teñidas con hematoxilina-eosina.

## **4.2. INVESTIGACIÓN BÁSICA**

### **4.2.1. LA BIOCAPA DEL *PROPIONIBACTERIUM ACNES***

#### **4.2.1.1. DESARROLLO Y OBTENCIÓN DE BIOCAPA *IN VITRO***

Se creó de un modelo *in vitro*, modificación del realizado por Ramage y Cols<sup>(81)</sup>, que se describe a continuación.

Las cepas de *PA* fueron recuperadas del cepario del servicio de Microbiología del Hospital de La Princesa, y correspondían a las aisladas de los pacientes del estudio (cepas 146450, 156052, 166545 y 166795 que correspondían a los pacientes 4, 10, 12 y 13 respectivamente). Dichas cepas se habían mantenido almacenadas en sangre de oveja desfibrinada y congeladas a -80°C hasta su uso. Tras su descongelación fueron subcultivadas en anaerobiosis (placas de agar-sangre incubadas en jarras anaerobias a 37°C), y en microaerofilia (placas de agar-chocolate en estufa al 5 % de CO<sub>2</sub>). El resto de cepas de los pacientes del estudio no pudieron ser procesadas por inviabilidad tras su congelación o por no estar disponibles en el cepario del departamento de Microbiología del hospital.

En el presente trabajo se analizará si existen diferencias en la adhesión del *PA* sobre distintos tipos de válvulas. Para este procedimiento se utilizaron válvulas obtenidas por dos vías:

- Unas correspondían a válvulas explantadas a pacientes operados en el Hospital de La Princesa, las cuales ya habían finalizado su

procedimiento rutinario en el laboratorio de Microbiología. Para su selección se tuvo en cuenta únicamente la integridad de la válvula, y no la causa por la que habían sido extirpadas. Dichas válvulas fueron cuidadosamente limpiadas de todo el material orgánico y de las suturas. En una parte de ellas se conservó el teflón, y en la otra quedó el anillo completamente limpio. Tras la limpieza manual fueron frotadas con estropajo y sometidas a proceso de sonicación (Ultrasons, Selecta<sup>R</sup>) a 50 Hz durante 20 minutos. Posteriormente se sometieron a esterilización mediante autoclavado (exposición durante 5 minutos a vapor de agua a 135° C). A este grupo de válvulas correspondían las siguientes:

- 15 válvulas Carbomédics
    - 10 con teflón (5 mitrales y 5 aórticas)
    - 5 sin teflón (5 aórticas)
  - 4 válvulas Sorin
    - 1 con teflón (1 mitral)
    - 3 sin teflón (3 aórticas)
  - 3 válvulas St Jude sin teflón
- 
- Otras 4 válvulas Sorin Bicarbon o fragmentos de ellas fueron obtenidas directamente de la casa comercial “Sorin-Biomedica”, y nunca antes habían sido utilizadas por defecto de fabricación. Estas se limpiaron, aún así, de idéntica forma que la previamente descrita:
    - 2 válvulas Sorin Bicarbon aórticas sin teflón
    - 1 anillo de válvula Sorin Bicarbon mitral sin teflón
    - 1 valva de una válvula Sorin Bicarbon mitral

El proceso de esterilización de todas ellas fue satisfactorio, y todos los controles de calidad del mismo, tanto diarios con D.E.R.T. (Steris<sup>®</sup>) como semanales con Espora (Biological indicators for steam sterilization, SGM Biotech, INC) fueron negativos. Posteriormente, siempre previo al experimento, se realizaba un control microbiológico de las válvulas, para descartar contaminación previa al mismo, para lo cual se realizaron improntas de las válvulas, una vez esterilizadas, sobre placas de agar sangre y agar chocolate, y se cultivaron en anaerobiosis y microaerofilia respectivamente. A los 7 días se realizaba la lectura de las placas, y se descartaron para el experimento las válvulas que presentaron cultivos positivos.

Se realizaron distintos experimentos, con las distintas cepas de *PA* y los distintos tipos de válvulas, con el procesamiento subsiguiente (**Ver Figura 2**): en un frasco estéril con 30 ml de medio de cultivo líquido anaerobio (tioglicolato) se mezcló un inóculo de la cepa seleccionada de *PA*, hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de  $1 \times 10^8$  UFC/ml, cantidad correspondiente a 0,5 unidades McPharlan. En el frasco se introducía la válvula con pinzas estériles, y posteriormente se mantenía en incubación a 37°C durante 72 horas. Cumplido ese tiempo las válvulas se extraían con pinzas estériles y se lavaban abundantemente a base de inmersiones consecutivas en Phosphate buffered - Saline (PBS) estéril para eliminar las bacterias no adheridas.

Previo al procesamiento posterior se realizó cultivo de control tanto de la válvula, mediante impronta en placa de agar, como del medio de cultivo, para

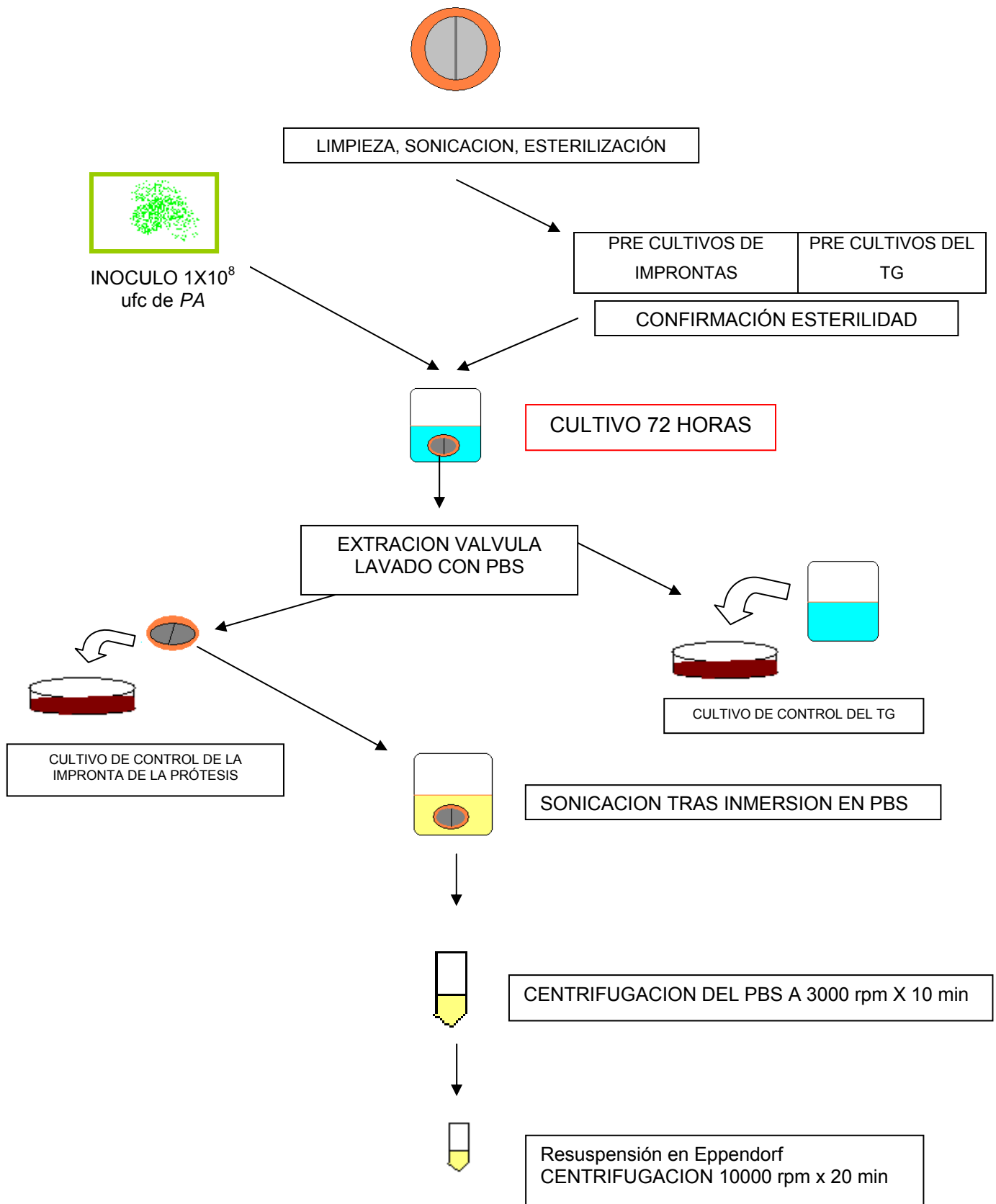
descartar contaminación por otros microorganismos. Dichos cultivos eran examinados con tinción de Gram. Los experimentos en los que se detectó contaminación o crecimiento diferente a *PA* fueron desechados.

Asimismo se realizaron controles negativos mediante el cultivo de válvulas estériles en tioglicolato sin inóculo bacteriano, sin evidenciarse crecimiento alguno.

Hecho esto, tras sumergir de nuevo las válvulas en 20 ml de PBS estéril se las sometía a un proceso de sonicación durante 5 minutos a 50 Hz (sonicador Ultrasons, Selecta ®). Tras la sonicación se extraía de nuevo la válvula, y el PBS del baño se sometía a centrifugación, primero durante 10 minutos a 3,000 x g, y posteriormente, y tras desechar el sobrenadante y resuspender en un tubo Eppendorf, 20 minutos a 10,000 x g. El material obtenido tras este procedimiento era resuspendido en 100 µl de PBS y conservado a -20 °C hasta su posterior procesamiento en Inmunología (ver apartado 4.2.1.2 VISUALIZACION DE LA BIOCAPA DE *PA*).

Como procedimiento paralelo se quiso comprobar la efectividad del proceso de esterilización mediante vapor para conseguir la inviabilidad del *PA*, para lo cual se realizó un inóculo de *PA* de  $1 \times 10^8$  ufc en dos medios distintos (tioglicolato y BHI) y fueron sometidos a hervor durante 45 minutos. Posteriormente se mantuvo en incubación en estufa ambos tubos y se realizaron pases en placas de agar-sangre, agar-chocolate y anaerobiosis. Todos resultaron estériles al 7º día del procedimiento, por lo que se concluye que esta bacteria no es capaz de resistir al proceso de esterilización.

**FIGURA 2: DESARROLLO IN VITRO DE BIOCAPA POR P. ACNES**  
 PBS: Phosphate Buffered saline, TG: Tioglicolato, rpm: revoluciones por minuto.





#### **4.2.1.2. VISUALIZACION DE LA BIOCAPA DE *PROPIONIBACTERIUM***

##### **ACNES**

En este trabajo se planteó la visualización de la biocapa del *PA* formada *in vitro* sobre válvulas protésicas mediante la tinción tanto de las bacterias con anticuerpos monoclonales, como de la matriz polimérica con calcoflúor.

##### **4.2.1.2.1 . MARCAJE CON ANTICUERPOS MONOCLONALES**

Para la demostración de la presencia de la biocapa producida por *PA* se siguió el protocolo previamente descrito por Tunney y cols<sup>(70)</sup> (**verFigura 3**).

Se tomaron las muestras obtenidas de la sonicación de las válvulas cultivadas (ver apartado 42.1.1. DESARROLLO Y OBTENCIÓN DE BIOCAPA). Una cantidad de 50 µl de cada muestra fue aplicada a cristales de inmunofluorescencia. Se dejaron secar al aire y posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído al 3% (3 minutos) y lavadas después con PBS (5 minutos). Una vez fijadas, se les aplicó un agente antiblanqueante para evitar la pérdida de la fluorescencia de los marcadores (TNB: ácido 5-tio-2 nitrobenzoico, las muestras fueron incubadas con QUBPa3, un anticuerpo monoclonal (ACMO) obtenido de sobrenadante de hibridoma de ratón, que ha demostrado su reactividad frente al *PA* en el estudio de Tunney y cols<sup>(70)</sup>, y que amablemente ha sido proporcionado por la Dra. Patrick y su equipo, del departamento de Microbiología e Inmunobiología de la Escuela de Medicina Clínica de la Queen's University, en Belfast (Reino Unido). Cada cristal fue inoculado con 50 µl de ACMO no diluido, incubado durante 45 minutos a 37°C,

y, después de un nuevo lavado con PBS durante 3 minutos, fueron reincubados con un fluorocromo anti-anticuerpos ( Anticuerpos anti-ratón, de cabra conjugados con Rodamina) a una dilución 1/200, durante 20 minutos a 37°C. Tras un lavado final los cristales fueron montados en un porta con la aplicación de mowiol y examinados con un microscopio de fluorescencia Leica. Las imágenes más relevantes fueron reproducidas por el software Leica QFISH v. 3.0 para windows. Se realizó una medición cuantitativa de la biocapa mediante una media aritmética del número de bacterias por campo, en 5 campos aleatorios.

De forma sistemática se realizaron controles negativos, con tinción de alícuotas de tioglicolato sin bacterias, sin evidenciarse fijación de los monoclonales.

Desafortunadamente algunas alícuotas de los ACMO llegaron desde su origen contaminadas. Por lo que, de los 40 modelos in Vitro de biocapa realizados (con las distintas cepas y sobre las distintas válvulas) sólo pudieron ser evaluados 11 por estar los restantes 29 teñidos con los anticuerpos pertenecientes a las alícuotas contaminadas. Se solicitaron nuevas alícuotas pero no estaban disponibles

Una selección de cristales fue examinada mediante microscopía láser confocal, con un modelo de microscopio Leica y el software Sp1, perteneciente al servicio de Inmunología del Hospital de La Princesa.

Los cristales con las muestras de prótesis de pacientes con EIVPPA fue examinada con otro microscopio confocal, del mismo modelo, perteneciente al Servicio de Inmunología del Hospital Gregorio Marañón.

### 4.2.1.2.2. TINCIÓN CON CALCOFLUOR

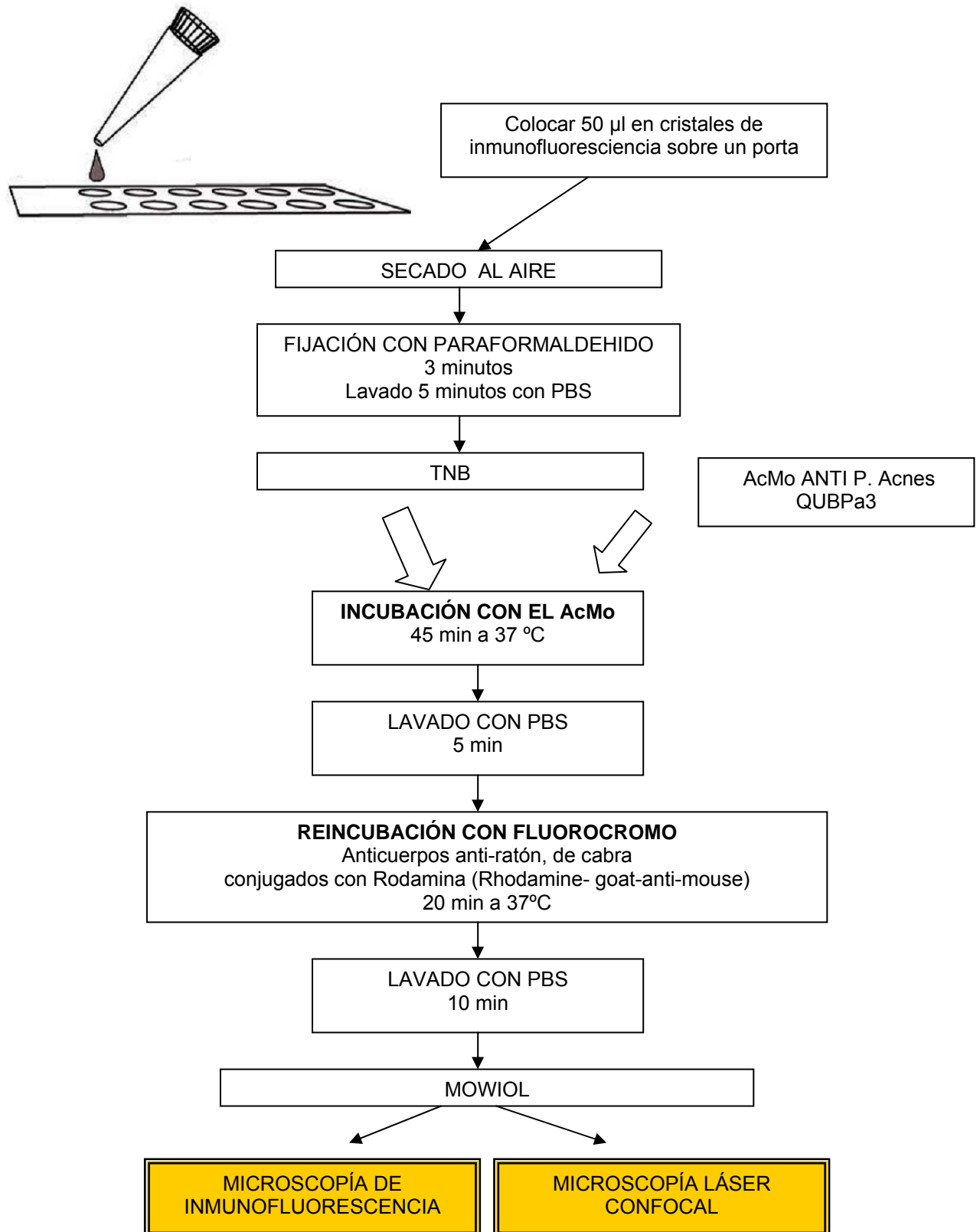
14 de las muestras fueron, además, fijadas con calcoflúor (Calcoflúor White-fluorescent Brightener 28, Sigma-Aldrich)<sup>1</sup>. Para ello, tras la fijación con el anticuerpo secundario se aplicaron 50 µl de calcoflúor (a una concentración de 10 µg/ml) en cada cristal y se dejó incubar en oscuridad durante 15 horas a 4° C. Para evitar fluorescencia inespecífica debida a grumos, el calcoflúor era preparado en el momento del experimento, y siempre era centrifugado durante 3 minutos, utilizando únicamente el sobrenadante.

La fijación con mowiol se realizó una vez concluido este paso. Para la visualización de estas muestras se utilizó asimismo el microscopio de fluorescencia Leica con un filtro ultravioleta (360 nm).

Posteriormente, y dados los hallazgos negativos, se siguieron otros protocolos: incubación durante 5 minutos, incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente, y en oscuridad

**FIGURA 3: PROTOCOLO DE INMUNOFLUORESCENCIA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES (AcMo)**

PBS: Phosphate Buffered saline, TNB: ácido 5-tio-2 nitrobenzoico



**4.2.2. DETERMINACIÓN DEL BIOTIPO DE****PROPIONIBACTERIUM ACNES.**

Para la identificación de las cepas de *PA* como pertenecientes al tipo I o al tipo II se utilizaron en primer lugar las muestras de biocapa obtenidas *in vitro* a partir de 4 cepas del cepario de *PA* productoras de endocarditis (cepas 146450, 156052, 166545 y 166795 respectivamente); en segundo lugar se comprobaron los resultados repitiendo el procedimiento directamente sobre la cepa en cuestión. Para ello se cogió una muestra de colonias bacterianas con un asa estéril directamente de la placa de agar en la que se encontraba, se diluyó en 0.5 ml de PBS y se aplicaron 50  $\mu$ l de dicha solución a un cristal de inmunofluorescencia. El procedimiento de inmunofluorescencia consistió en el mismo descrito previamente (apartado 4.2.1.1.2.1), siendo la única variación la utilización en este caso de anticuerpos monoclonales anti-*PA* y específicos para cada biotipo, y así se usaron QUBPa1, con especificidad para unirse a *PA* tipo I, y QUBPa2, con especificidad para el *PA* tipo II, los cuales fueron también cedidos por el equipo de la Dra. Patrick. Cada cepa fue a su vez analizada por separado con ambos tipos de anticuerpos.

Las imágenes fueron analizadas con un microscopio de inmunofluorescencia Leica al igual que en el procedimiento previo.

Se analizaron en segundo lugar otras dos cepas de *PA* (165948 y 165980) obtenidas de prótesis de pacientes con EIVPPA que se diagnosticaron en el periodo de realización de estos experimentos; la determinación del biotipo de ellas se realizó directamente sobre la biocapa extraída de las prótesis, y en

segundo lugar, sobre la cepa de la placa de agar en la que había crecido, como se ha comentado previamente.

#### **4.2.3. DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN VEGF EN SANGRE PERIFÉRICA DE LOS PACIENTES CON EIVPPA**

En el presente trabajo se determinarán los polimorfismos del gen VEGF de los pacientes con EIVPPA y se compararán con los de la población normal, con el objeto de analizar si existe algún polimorfismo que sea más frecuente en esta población

Se estableció contacto telefónico con los pacientes para realizar extracción de sangre en el hospital. Dicha extracción se realizó en 9 de los 16 pacientes. 4 habían fallecido en el momento de la localización, 2 presentaban dificultades para trasladarse a la realización de la prueba, y 1 no fue localizado ya que había abandonado el seguimiento. Sólo 1 de los 9 pacientes (caso 16) presentaba la EIVPPA en el momento del análisis.

Una vez obtenida ésta se realizó la extracción de ADN mediante el kit *Puregene* (R&D) para sangre y se siguió el siguiente protocolo:

- Disponer 5 ml de la sangre del paciente en un tubo Falcon.
- Verter en él 15 ml de RBC Lysis Solution (*Puregene* TM).
- Incubar la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente (RT)

mientras se va invirtiendo.

- Tras centrifugar 5 minutos a 1800 rpm, retirar el sobrenadante, conservando el pellet.
- Vortexear el pellet y resuspender las células.
- Añadir 5 ml de Cell Lysis Solution y resuspender.
- Tras añadir 25 µl de Rnase A Solution, invertir 25 veces y reincubar durante 15 minutos a 37°C
- Añadir 1,5 ml de Protein Precipitation Solution y vortexear 20 segundos
- Tras centrifugar de nuevo 5 minutos a 2000 rpm, verter el sobrenadante de la muestras en un tubo Falcon con 5 ml de Isopropanol, desechando el pellet.
- Invertir sucesivas veces hasta que aparezca la hebra de DNA
- Tras centrifugar 3 minutos a 2000 rpm se decanta el sobrenadante, sin perder el pellet.
- Lavar con 5 ml de Etanol al 70% para blanquear la hebra y centrifugar durante 3 minutos a 2000 rpm
- Decantar el sobrenadante cuidadosamente y pasar la hebra de ADN a un eppendorf (previamente calentado a 65°C) con 600 microlitros de DNA hydration Solution.
- Mantener durante 1 hora a 65°C y posteriormente a temperatura ambiente durante una noche. Posteriormente la muestra se conservará a -80°C.

Una vez extraído el ADN se determinaron los niveles de VEGF en suero

## MATERIAL Y MÉTODOS

mediante una técnica de ELISA (R&D). Posteriormente se analizaron los polimorfismos -2578C/A, -1154G/A, y -634G/C del VEGF mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica para los dos primeros y seguida de digestión con una endonucleasa de restricción (PCR-RFLP) para el último. Inicialmente también se analizó el polimorfismo +936C/T, pero posteriormente se desestimó incluirlo en la comparativa, por no resultar de interés.

Estos datos se correlacionaron con los encontrados en población sana del área correspondiente al Hospital de La Princesa, a partir del estudio de Gamallo y cols (Datos no publicados).



# RESULTADOS

---

## **5.1. INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

### **5.1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS MÁS REPRESENTATIVOS**

#### **5.1.1.1 CASO 1**

Varón de 53 años, portador de tubo valvulado y prótesis biológica por disección aórtica. Un año antes de comenzar con los síntomas se le realizó una sustitución valvular aórtica con prótesis metálica aórtica St. Jude. Seis meses después se le realizó una limpieza dental sin profilaxis antibiótica. Tres días antes del ingreso comienza con fiebre y episodios repetidos de disfasia motora. En la exploración se auscultaba un soplo sistólico en región paraesternal izquierda. Se realizó un ecocardiograma transtorácico (ETT) y transesofágico (ETE) que mostraron una leve insuficiencia aórtica, sin datos sugerentes de endocarditis. Tras iniciar tratamiento con vancomicina y gentamicina el paciente quedó asintomático. En los hemocultivos extraídos creció al 9º día *PA* en 6/6. Tras una reacción alérgica a la vancomicina, ésta se sustituyó por amoxicilina-clavulánico IV. Tras finalizar 6 semanas de tratamiento parenteral se pautó Amoxicilina 750 mg/8 h vía oral como tratamiento oral supresor (TOS), que el paciente tomó durante 4,5 meses. Una gammagrafía con leucocitos marcados con Indio realizada entonces no mostró captación en el material protésico.

Dieciocho meses después de finalizar el tratamiento antibiótico el paciente comenzó con fiebre intermitente y síntomas musculoesqueléticos progresivamente más intensos (artralgias, miositis localizadas y poliartritis recurrente). Seis de seis hemocultivos fueron estériles tras 30 días de incubación y dos ETT y ETE realizados al inicio de los síntomas y a los 3 meses no mostraron signos de endocarditis. El paciente rehusó ingresar o ser

tratado hasta 4 meses después del comienzo de los síntomas, cuando desarrolló fiebre continua, hormigueo y dolor en la cara dorsolateral del pie izquierdo, con dificultad para mover los dedos. Se detectó un soplo sistólico y diastólico grado I/IV, y esplenomegalia de 4 cm, la flexión del pie izquierdo estaba abolida y existía hipoestesia de distribución S1. Veinticuatro horas después de su ingreso el paciente sufrió un cuadro de desorientación y trastorno de la memoria sin otros signos neurológicos, y se evidenció en la TC una hemorragia temporal izquierda intraparenquimatosa abierta a ventrículos, que se complicó con una hemorragia subaracnoidea. No se detectaron aneurismas en la arteriografía. De nuevo 6 hemocultivos obtenidos previos al tratamiento fueron negativos, y el ETE y la RMN cardíaca fueron negativos para endocarditis o endarteritis. El electromiograma mostró una lesión periférica del nervio tibial posterior izquierdo. Ante la sospecha de recaída de la endocarditis por *PA*, se inició tratamiento con penicilina G IV, tras lo que la fiebre y los síntomas musculoesqueléticos desaparecieron. Un nuevo efecto secundario (anemia hemolítica por penicilina) obligó a cambiar el tratamiento a clindamicina IV. Tras completar el tratamiento parenteral 6 semanas el paciente fue dado de alta con TOS con clindamicina. Todos los síntomas neurológicos se resolvieron.

El paciente no siguió dicho tratamiento y abandonó el seguimiento en consultas. Se mantuvo asintomático hasta 1 mes después del alta, en que de nuevo comenzó a sufrir episodios recurrentes de artritis en tobillo izquierdo, rodillas y muñecas junto a fiebre, tiritona y síndrome constitucional. Acudió a distintos centros médicos donde recibió tratamiento sintomático con antiinflamatorios. En uno de ellos se realizó un ecocardiograma transtorácico, sin evidenciarse datos sugerentes de endocarditis, y además se extrajeron hemocultivos, que resultaron estériles.

5 meses después de reiniciarse los síntomas requirió ingreso por dolor lacinante en el pie izquierdo, siendo diagnosticado de neuropatía sensorial, y tratado con carbamacepina.

Un mes después, y tras 3 años y 10 meses desde el inicio de los síntomas reingresó de nuevo en nuestro hospital. Se auscultó un soplo diastólico aórtico y se apreciaron embolismos periféricos múltiples (conjuntiva, bazo, riñón),

esplenomegalia dolorosa, aneurismas micóticos en ambas arterias poplíteas y neuropatía periférica. El ETE detectó una insuficiencia aórtica moderada, una colección de pus en la raíz aórtica y vegetaciones en la prótesis aórtica y en la válvula tricúspide. Se inició tratamiento con gentamicina y clindamicina IV, siendo ésta última sustituida por cloranfenicol por persistencia de la fiebre. Seis hemocultivos fueron negativos tras 30 días de incubación. Tres semanas después del ingreso el paciente fue intervenido realizándose recambio valvular, sustitución del tubo valvulado y esplenectomía, falleciendo durante la intervención. Macroscópicamente se objetivó un coágulo en la porción distal del tubo aórtico, próximo a la raíz aórtica, pero no se objetivaron vegetaciones ni dehiscencia, aunque la histología mostró datos de endocarditis en la prótesis y en el tubo valvulado aórtico.

Tras 28 días de incubación creció *PA* en la prótesis aórtica.

### **5.1.1.2. CASO 3**

Varón de 68 años portador de prótesis metálica mitral Carbomédics desde hacía 8 años. Un año antes de iniciar los síntomas se le realizó una colonoscopia con polipectomía. Al año comenzó a sufrir episodios de déficit neurológicos variados (fundamentalmente déficits visuales e inestabilidad para la marcha) tanto transitorios como establecidos, que fueron achacados a su condición de portador de prótesis, pero que se repitieron a lo largo de 5 años a pesar de un buen rango de anticoagulación y de añadir antiagregación. Nunca padeció fiebre, pero paulatinamente al cuadro neurológico se fueron añadiendo síntomas y signos de insuficiencia cardíaca. En las exploraciones ecocardiográficas al inicio de los síntomas (tanto en el ETT como en el ETE) no se evidenciaron disfunción protésica ni datos de endocarditis. En exploraciones posteriores se detectó una estenosis mitral progresiva debido a inmovilidad de uno de los discos protésicos. Dicho hallazgo y el progresivo deterioro de su capacidad funcional cardíaca indicaron la cirugía de recambio valvular, en la cual el cirujano advirtió abundante pannus grisáceo, por lo que la válvula fue enviada para cultivo. En la prótesis creció en siembra directa un *PA*. Se instauró tratamiento antibiótico con vancomicina y, posteriormente,

penicilina tras conocer los resultados del cultivo. Al alta se instauró TOS que siguió durante menos de 1 año. Tras un seguimiento de 5 años el paciente no ha vuelto a tener ningún otro déficit neurológico ni otros datos sugerentes de recaída clínica, y actualmente únicamente padece defectos residuales de sus accidentes cerebrovasculares previos.

### **5.1.1.3. CASO 4**

Mujer de 49 años, portadora de prótesis metálicas aórtica y mitral ambas Omnicarbon desde hacía más de 9 años. Cinco meses antes del inicio de los síntomas sufrió una herida en un dedo del pie de evolución tórpida, ocasionada por el pinchazo con un rosál. A los 5 meses comenzó a notar disnea y ortopnea progresivas, que previamente nunca había tenido, junto con síndrome constitucional. En la anamnesis exhaustiva finalmente recordó febrícula intermitente, sin datos de infección a otros niveles. En un control ecocardiográfico rutinario (ETT) se detecta una insuficiencia aórtica e insuficiencia mitral por prótesis disfuncionantes, cuando los controles anteriores habían sido estrictamente normales. Tras 12 meses de sintomatología, se decide para cirugía de recambio valvular, y en el acto quirúrgico el cirujano advierte la presencia de abundante pannus grisáceo perivalvular, por lo que ambas prótesis son remitidas para cultivo. En una de ellas crece al 6º día un *PA*. Se pauta tratamiento con ceftriaxona y posteriormente TOS con amoxicilina durante 3 años. No ha presentado recaídas tras 4 años de seguimiento.

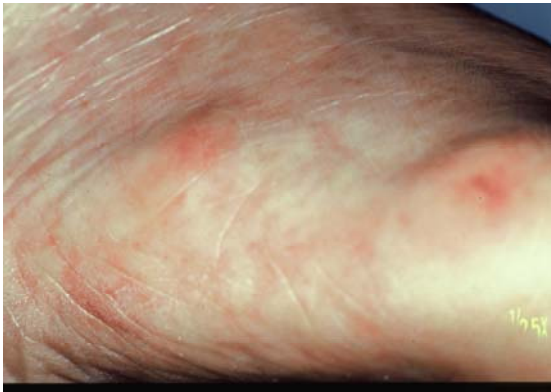
### **5.1.1.4. CASO 6**

Varón de 72 años, al que se le había implantado una prótesis aórtica metálica por una insuficiencia de etiología no filiada hacía 7 meses; en dicho acto quirúrgico se evidenció un absceso, siendo el cultivo negativo. Recibió, inicialmente, tratamiento para Fiebre Q por una serología dudosa, pero posteriormente se suspendió tras recibir los resultados negativos de la

## RESULTADOS

serología de confirmación. En dicho ingreso presentó, tras la cirugía, lesiones dolorosas en pulpejos de los dedos de los pies, inicialmente violáceas que después se necrosaban, y que mejoraron tras la toma de antibióticos, volviendo a empeorar posteriormente al suspenderlos. Diez días antes del ingreso en nuestro centro comienza con fiebre, tiritona y empeoramiento de las lesiones cutáneas. Al ingreso mostraba las lesiones reflejadas en las fotos 1 y 2, junto a un soplo sistólico eyectivo, anemia normocítica con insuficiencia renal, microhematuria y proteinuria de menos de 3 g/día.

En el ETE sólo se objetivó un pequeño leak periprotésico con válvula normofuncionante sin signos ecocardiográficos de endocarditis. Se extrajeron hemocultivos, en los que creció en 2/3 un *PA* sensible a la penicilina, en la 3ª semana de incubación. La biopsia de piel mostró una necrosis epidérmica de carácter focal, con cultivo estéril.



**FOTOS 1 y 2:** FRIALDAD EN AMBOS PIES, CON COLORACIÓN ERITEMATO-VIOLÁCEA MÁS MARCADA EN 3º, 4º Y 5º DEDOS DE PIE DCHO, SUGERENTES DE LIVEDO RETICULARIS, Y ÚLCERA NECRÓTICA CON COSTRA EN 5º DEDO DE PIE DCHO.

El paciente fue tratado 6 semanas con penicilina IV con buena respuesta clínica, desapareciendo la fiebre, las lesiones necróticas, la proteinuria y mejorando la livedo reticularis y la función renal. Se pautó tratamiento oral supresor (TOS) con amoxicilina, que no siguió correctamente. Al décimo mes del alta sufrió empeoramiento y aparición de nuevas lesiones cutáneas, junto con deterioro de la función renal y reaparición de la proteinuria. Se realizaron anticuerpos antifosfolípidos IgG e IgM que resultaron positivos. Los hemocultivos de larga incubación fueron negativos. Se pautó tratamiento antibiótico, tras lo que desapareció la fiebre y la proteinuria, y se decidió

recambio valvular. En el cultivo de la prótesis extraída creció un microorganismo morfológicamente similar a *Propionibacterium* que no pudo ser definitivamente identificado. Posteriormente no volvió a sufrir recurrencias, pero la insuficiencia renal mostró un curso lentamente progresivo, por lo que se realizó biopsia renal, que mostró glomérulos esclerosados. Falleció por muerte súbita en su domicilio dos años después.

#### **5.1.1.5. CASO 13**

Varón de 48 años, con antecedentes de acné conglobata en la juventud, portador de prótesis mecánicas Sorin (mitral y aórtica) desde hacía 19 años. Cuatro años después de la sustitución valvular comienza con un cuadro leve de artromialgias, febrícula y lesiones cutáneas. Fue visto en consultas de reumatología y diagnosticado de psoriasis cutánea y articular, realizando por ello varios tratamientos inmunosupresores. La febrícula se achacó en numerosas ocasiones a mal control de la enfermedad. Durante el periodo sintomático describía además episodios de inflamación de la base del primer metacarpiano, que fue interpretada como tenosinovitis y tratada en numerosas ocasiones con infiltraciones de esteroides. A los 9 meses de iniciarse la clínica reumática sufrió un accidente isquémico transitorio que quedó sin estudio. Durante un periodo de 15 años sus síntomas reumatológicos junto con la fiebre fueron oscilantes sin llegar a desaparecer. En los últimos 2 años se añaden un total de 5 episodios de déficit neurológico (transitorios o establecidos) a pesar de correcta anticoagulación. En el último episodio le es detectado por ETT + ETE un trombo laminar mitral, cuando las anteriores exploraciones ecocardiográficas habían sido normales, por lo que el paciente es intervenido. El cirujano advirtió, además de la trombosis protésica, abundante pannus grisáceo en la prótesis mitral, y remitió la muestra a microbiología. Tras 7 días de incubación creció en siembra directa un *PA*. Se pautó tratamiento con ceftriaxona y posteriormente TOS con amoxicilina (1 g/8 h), y el paciente quedó asintomático, refiriendo además mejoría de las lesiones psoriásicas. A los 2 años, tras suspensión del TOS sufrió un nuevo accidente cerebrovascular agudo acompañado de fiebre y empeoramiento de las lesiones cutáneas. El

ETE fue negativo para endocarditis pero en los hemocultivos creció *Propionibacterium* en 1/6. Tras instaurar tratamiento con ceftriaxona durante 6 semanas, seguidas de TOS indefinido con amoxicilina, el paciente se mantiene asintomático durante 2 años de seguimiento.

En este paciente se planteó el diagnóstico de síndrome de SAPHO (Sinovitis, Acne, Pustulosis, Hiperostosis y Osteítis), criterios de los cuales cumplía los 3 primeros más la osteítis, pero dado que esta última resultaba ser una osteítis muy leve e inespecífica, y debido al hecho de existir un diagnóstico alternativo de artropatía psoriásica, no se catalogó finalmente al paciente como tal.

## **5.1.2. CLÍNICA**

### **5.1.2.1. EPIDEMIOLOGÍA**

La edad media fue de 59,4 años (rango 41-78). Trece pacientes fueron hombres. Trece se localizaron en prótesis metálicas y 3 en biológicas (ver **tabla 2**).

Diez pacientes presentaban enfermedades subyacentes: la más común la insuficiencia renal crónica. El 50% de los pacientes habían sufrido fiebre reumática, siendo ésta la cardiopatía de base que condujo al recambio valvular. Asimismo, entre los antecedentes médicos, figura el hecho de que el 25% habían tenido acné conglobata en la juventud.

El tiempo entre la implantación de la prótesis y la aparición de los síntomas osciló entre 1 semana y 27 años: en 7 pacientes este periodo fue  $\leq 1$  año, y en 9 fue mayor de 8 años. En el primer grupo, sólo en un paciente se detectó una posible puerta de entrada para el PA diferente de la cirugía de sustitución valvular. Sin embargo, en el segundo grupo existió siempre un posible factor de riesgo en relación con interrupción de la barrera cutáneo-mucosa. Tres pacientes habían tenido EI previa por *S.pneumoniae*, *S. epidermidis* y con cultivo negativo, respectivamente.



Caso	Enfermedades subyacentes	Tipo de prótesis	Tiempo desde implantación hasta síntomas	Factor de riesgo (tiempo desde el suceso hasta síntomas)	Presentación clínica	Retraso diagnóstico	Ingresos previos	Síntomas y signos en el ingreso diagnóstico	TTO REALIZADO	TOS	Recálculas			Evolución
											Tiempo hasta la recaída	Retraso diagnóstico	Síntomas y signos	
1	Hepatopatía por VHC Hipotiroidismo	Metálica aórtica St Jude + tubo valvulado aórtico	1 A	Limpiosa dental (5 Me )	Fiebre. Neurológica.	3 D	-	Fiebre, AIT, nuevo soplo.	A	SI	18 Me	4 Me	Fiebre, irritación, miosis, ACVA hemorrágico	Exitus en la 2ª recaída (en quirófano)
2	-	Prótesis biológica aórtica Carpentier	11 Me	-	Disfunción protésica severa asintomática	22 Me	1	Fiebre, escalofríos, dolor pleurítico, nuevo soplo	Q + A	-	1 Me	17 Me	Poliartritis recurrente, neuropatía periférica, embolismos periféricos, aneurismas miocárdicos, infartos esplénicos, miosis.	Exitus (dehiscencia protésica severa, muerte en quirófano)
3	-	Metálica mitral Carbomedics	8 A	Polipsectomía (1 A)	Neurológica	5 A	6	ICC, AIT, dolor pleurítico, nuevos soplos disminuidos.	Q + A	NO	-	-	-	Asintomático
4	-	Metálicas mitral + aórtica (ambas Omnicarbon)	9 A y 3 Me	Herida con espina de rosal, curso tórpido (5 Me)	Síndrome constitucional, fiebre	12 Me	-	ICC, fiebre, astenia, nuevo soplo	Q + A	SI	-	-	-	ACVA carotídeo 2 años después
5	Cáncer de vejiga, IRC obstructiva.	Biológica aórtica Donald-Ros	8 A y 9 Me	Anastomosis ureteroileal (9 A)	Cardiológica (angor por IAo)	3 Me	1	ICC, angor, nuevo soplo	Q + A	SI	-	-	-	Asintomático
6	IRC, Anemia crónica.	Metálica Carbomedics	1 Se	-	Cutánea	7 Me	1	Fiebre, escalofríos, ICC, nuevo soplo, lesiones necróticas dolorosas con livedo reticularis en pliegues de dedos.	A	S	10 Me	2 Me	Fiebre, lesiones necróticas, ICC, dolor abdominal, proteinuria nefrótica, insuficiencia renal progresiva, síndrome antifosfolípido.	IRC e ICC. Exitus 2 años después (muerte súbita en domicilio)
7	IRC	Metálicas mitral + aórtica (ambas Sorin)	4 Me	-	Disfunción protésica severa asintomática	2 A	-	ICC, fiebre, nuevo soplo, síncope	Q + A	SI	-	-	-	ICC Nueva EI (reinfección)
8	-	Metálica mitral St. Jude	13 A	Discectomía C5-C6 (6 Me ) Mesoterapia (1 Me ) Fisura anal recurrente	Síndrome constitucional, fiebre	7 Me	1	Fiebre, sudoración, astenia, nuevo soplo	A	NO	1 Me	5 Me	Astenia, fiebre, sudoración, síndrome constitucional	Asintomático
9	EPOC, IRC	Metálica aórtica Carbomedics	5 Se	-	Disfunción protésica severa asintomática	5 Se	1	ICC, nuevo soplo	Q + A	NO	-	-	-	Dehiscencia protésica aguda (a los 8 meses), cultivos negativos. Dehiscencia protésica aguda (a los 4 meses), ICC.
10	IRC	Biológica aórtica Carpentier	4 Me	-	Cardiológica (IAM)	1 Me	-	Angor, nuevo soplo.	Q + A	NO	-	-	-	Trasplante cardíaco. Asintomático
11	-	Metálica mitral Carbomedics	11 A	Colecistitis aguda (12 Me ) Osteosíntesis en pierna (6 A)	Disfunción protésica severa asintomática	6 Me	-	Palpitaciones, nuevo soplo	Q + A	NO	-	-	-	Asintomática
12	DM tipo 2	Metálica aórtica Björk	19 A	Resección de lesión hiperpigmentada en pierna (2 A)	Cardiológica (ICC)	12 Me	-	ICC	Q + A	NO	-	-	-	Asintomático
13	Atritis psoriásica	Metálicas mitral + aórtica (ambas Sorin)	4 A	Onicopatía psoriásica. Infiltraciones recurrentes por tenosinovitis (desde hace 7 años)	Neurológica, fiebre, manifestaciones reumáticas	15 A	3	ACVA, fiebre, astenia, ICC, artralgia, mialgia, nuevo soplo.	Q + A	NO	2 A	3 Se	ACVA, fiebre.	Asintomático
14	Adenocarcinoma de endometrio.	Metálica mitral Sorin	3 Me	-	Disfunción protésica severa asintomática	3 Me	1	Nuevo soplo	Q + A	SI	-	-	-	Asintomática
15	DM tipo 2	Metálica mitral Omnicarbon	11 A	Implantación de marcapasos (5 A)	Cardiológica (ICC)	2 Se	-	Nuevo soplo, ICC	Q	-	-	-	-	Exitus por ACVA de repetición postquirúrgico
16	-	Metálicas mitral y aórtica (Björk)	27 años	Cirugía de varices (1 mes)	Cardiológica (ICC)	5 meses	-	Nuevo soplo, ICC	Q + A	-	-	-	-	Dehiscencia protésica, Imi severa

**TABLA 2: EPIDEMIOLOGÍA, CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EVOLUCIÓN DE 16 EI PROTÉSICAS POR P. ACNES.**

A: Años; AB: Antibioterapia; ACVA: Accidente cerebrovascular agudo; AIT: accidente isquémico transitorio; D: días; DM: Diabetes mellitus; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; H: Hombre; IAM: Infarto agudo de miocardio; IAo: Insuficiencia aórtica; ICC: Insuficiencia cardíaca congestiva; IRC: Insuficiencia renal crónica; Me: Meses; M: Mujer; Q: Tratamiento quirúrgico (sustitución valvular); Se: semanas; TOS: Tratamiento oral supresor.

### **5.1.2.2. CLÍNICA**

Las formas de presentación clínica (ver **tabla 2 y Gráfico 3**) incluyeron: disfunción protésica severa asintomática (31%), insuficiencia cardíaca (19%), síndrome coronario (12,5%), fiebre (25%), asociada a síndrome constitucional (12,5%) y a síntomas neurológicos (12,5%), síntomas neurológicos sin fiebre (6,2%), manifestaciones cutáneas (6,2%) y manifestaciones reumatológicas (6,2%) (artromialgias y tenosinovitis de repetición).

La fiebre fue, en 3 de ellos, intermitente, no superó los 38,5°C y no se acompañó de tiritona.

Todos los pacientes con sintomatología neurológica tuvieron eventos isquémicos: en 1 se produjeron varios AITs en el mismo día, y en 2 numerosos episodios de ictus a lo largo de 5 y 6 años, respectivamente (ver apartado 5.2.1, casos 3 y 13). En ambos casos dichos ictus acontecieron a pesar de una correcta anticoagulación oral y aún a pesar, en 1 de ellos, de asociar antiagregación. En este último enfermo, previo al diagnóstico, se habían realizado varios estudios ecocardiográficos transtorácicos y 1 transesofágico, sin que se objetivara una fuente embolígena cardíaca.

En el paciente que debutó con manifestaciones cutáneas, se apreciaron lesiones violáceas dolorosas costrosas en los pulpejos de los dedos de los pies, que posteriormente se necrosaban, junto con livedo reticularis en ambos pies. Dichas lesiones tuvieron un curso paralelo al control de la infección, resolviéndose prácticamente durante el tratamiento y reapareciendo, con nuevos focos de necrosis, en las recaídas. Las biopsias de piel mostraron datos inespecíficos (ver apartado 5.1.1.4)

En 8 pacientes la clínica motivó, previamente, el ingreso hospitalario sin que se llegara al diagnóstico de EI (mediana de ingresos previos 1, con rango 1-6). Seis pacientes no presentaron fiebre en estos ingresos. En 2 pacientes se sustituyó la válvula afecta por sospecha de EI, pero el diagnóstico infeccioso fue descartado aunque las muestras quirúrgicas no se sometieron a larga

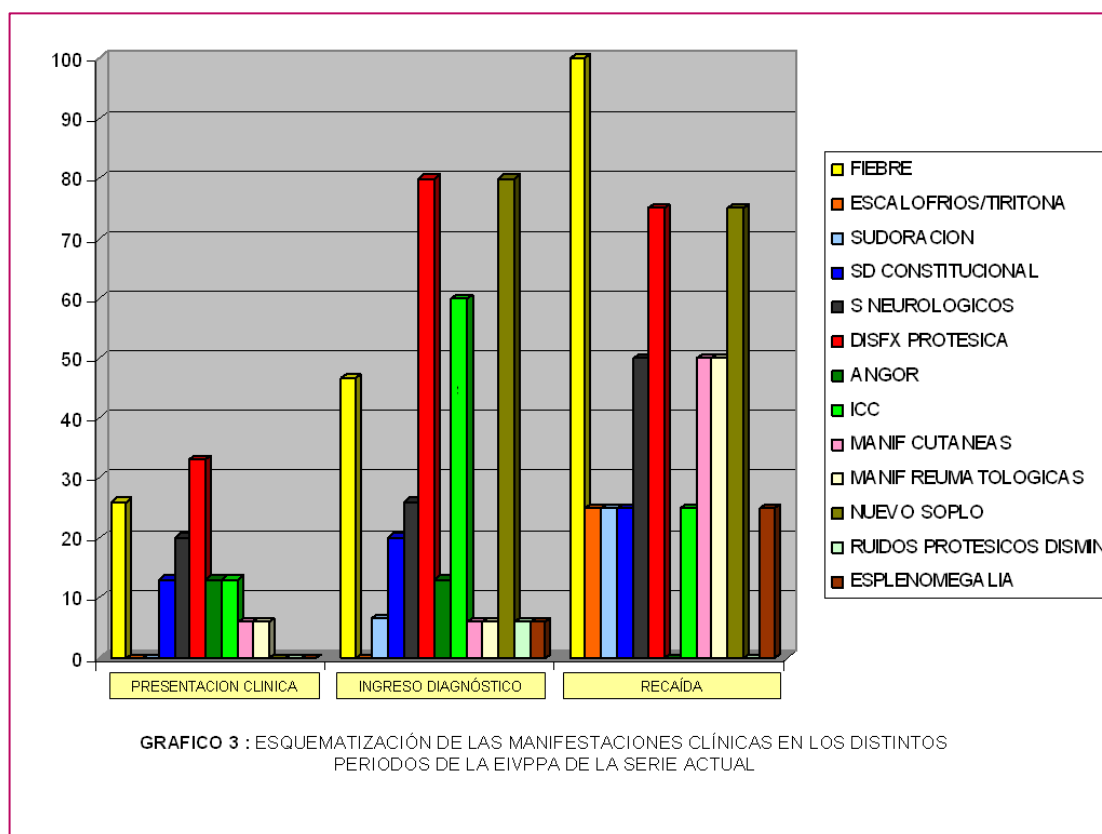
## RESULTADOS

incubación. Ambos pacientes presentaron dehiscencia valvular periprotésica al poco tiempo del recambio.

Al ingreso diagnóstico existía insuficiencia cardiaca en 62.5%, fiebre en 43.7% (2 habían debutado como disfunción protésica asintomática), nuevo soplo en 81.2%, disminución de los ruidos protésicos en 6,2% y esplenomegalia en 6,2%. El retraso diagnóstico fue < 1 mes en 3, entre 1 y 12 meses en 9 y > 12 meses en 4 pacientes.

En las recaídas las manifestaciones clínicas fueron, generalmente, semejantes a las que habían tenido en su primer episodio, excepto en el caso 1 y 6 que fueron muy prolijas (ver apartado 5.1.1).

Una paciente (caso 4, ver apartado 5.1.1.3) sufrió a los 2 años del episodio de EIVPPA un accidente cerebrovascular agudo, a pesar de una correcta anticoagulación. No se confirmó recidiva de la endocarditis al resultar tanto los hemocultivos como el ecocardiograma negativos para ello.



### **5.1.2.3. ECOCARDIOGRAFÍA**

Durante el periodo previo al diagnóstico se realizaron 14 ecocardiogramas transtorácicos y 4 transesofágicos a 13 pacientes (**Ver Figura 3**). El 71.4% de las prótesis aórticas metálicas presentaban disfunción, 57% por dehiscencia y 14.2% por estenosis. El 42.8% de las prótesis metálicas mitrales fueron disfuncionantes: 28.5% estenóticas, 14.2% insuficientes; en el 14.2% se detectaron vegetaciones sin disfunción protésica. El 100% prótesis aórticas biológicas mostraban disfunción: 33.3% por dehiscencia, 66.6% por distorsión de velos — 33.3% por calcificación produciendo insuficiencia y 33.3% por engrosamiento, comportándose como estenótica.

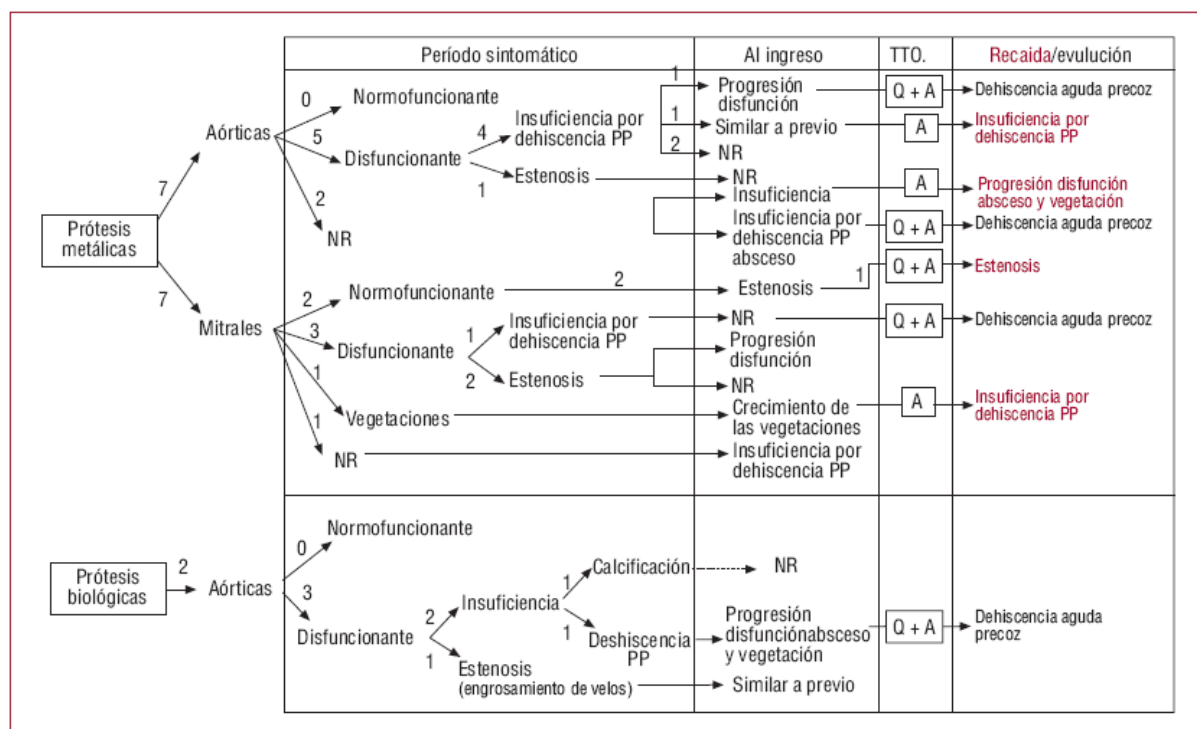
En 3 pacientes se realizó además cateterismo cardiaco debido a que no se sospechó en ese momento la endocarditis protésica.

Al ingreso diagnóstico se repitió el ecocardiograma en 8 pacientes, y se realizó de novo en 3. En el primer grupo se encontró progresión de la disfunción protésica en el 37.5% — uno de ellos con vegetaciones y abscesos; crecimiento de vegetación (12.5%); aparición de nueva disfunción protésica (25%), y ausencia de cambios (25%). El tiempo entre la última exploración durante el periodo sintomático y la primera en el ingreso diagnóstico varió entre 2 semanas y 2 años.

En el 100% de los ecocardiogramas realizados de novo se objetivó insuficiencia por dehiscencia periprotésica, en una asociada a absceso.

En 6 pacientes no se repitió la exploración ecocardiográfica tras el tratamiento.

## RESULTADOS



**FIGURA 4: HALLAZGOS ECOCARDIOGRÁFICOS DE 16 EIVPP A LO LARGO DE SU EVOLUCIÓN CLÍNICA**

En la tabla se muestran los hallazgos ecocardiográficos principales en los 16 casos de EI protésica por *Propionibacterium acnes*, en el período sintomático, en el momento del diagnóstico y en las recaídas, en aquellos casos en los que estas se produjeron (en rojo). Asimismo se especifican los casos que presentaron dehiscencia protésica precoz en el seguimiento (en azul). En todos estos casos se especifica, asimismo, el tipo de tratamiento que se había realizado. En el resto de pacientes se realizó recambio valvular y la exploración ecocardiográfica post-tratamiento fue normal. A: Antibioterapia; NR: Ecocardiograma no realizado; PP: Periprotésica; Q: Tratamiento quirúrgico TTO: Tratamiento.

En la recaída, el 66.6% de los pacientes que no habían sido operados presentaron progresión de la dehiscencia protésica previa, y el 33.3% una dehiscencia nueva. El paciente que recayó tras el recambio valvular, presentó la misma disfunción protésica que en el primer episodio (estenosis) (ver **Tabla 3**)

## RESULTADOS

	TIPO DE DISPOSITIVO	ECOCARDIOGRAMA		Tiempo entre ecos	TTO REALIZADO	ECOCARDIOGRAMA POST-TRATAMIENTO	ECOCARDIOGRAMA EN LA RECAIDA	
		AL INICIO DE LOS SÍNTOMAS O EN EL PERÍODO SINTOMÁTICO	AL INGRESO					
1	Prot. Met. Ao St Jude + tubo valvulado aórtico	-	<b>ETT:</b> IAo leve. <b>ETE:</b> Similar al ETT	-	A	<b>ETT:</b> similar al previo	ETE: Similar al previo	<b>ETE:</b> IAo moderada + colección de pus en la raíz aórtica. Vegetación aórtica y tricúspide.
2	Prot. Biol. Ao. Carpentier	<b>ETT:</b> Dehiscencia protésica. IAo severa <b>CATERETERISMO:</b> IAo masiva	<b>ETE:</b> Vegetación de 13x15 mm en anillo Ao. Absceso entre anillo y cortinilla mitroaórtica. Dehiscencia periprotésica severa	10 meses	Q + A	<b>ETT:</b> Nueva dehiscencia protésica aguda, IAo severa	-	
3	Prot. Met. Mi. Carbomedics	<b>ETT + ETE:</b> Normal	<b>ETT:</b> EMI severa. IMi leve. <b>ETE:</b> Disco posterior inmóvil por ecos densos entre el disco y el anillo, (¿pannus, trombos?). IMi moderada	2 años.	Q + A	<b>ETT:</b> Prótesis normofuncionante	-	
4	Prot. Met. Ao. y Mi. (ambas Omnicaarbon)	<b>ETT:</b> IAo moderada. Dehiscencia periprotésica. IMi leve.	-	1 mes	Q + A	<b>ETT:</b> Prótesis mitral y aórtica normofuncionantes	-	
5	Prot. Biol. Ao. Donald-Ros	<b>ETT:</b> Válvula Ao biológica calcificada. <b>CATERETERISMO:</b> IAo severa	-	3 meses	Q + A	-	-	
6	Prot. Met. Ao. Carbomedics	<b>ETT:</b> Dehiscencia, IAo leve	<b>ETT:</b> Dehiscencia periprotésica con IAo leve. Aumento de ecodensidad en hemidisco anterior sugerente de EI (no concluyente)	7 meses	A	<b>ETT:</b> Prótesis mecánica aórtica normofuncionante.	<b>ETT:</b> Dehiscencia periprotésica con IAo moderada. Aumento de la ecogenicidad de los discos de manera difusa.	
7	Prot. Met. Ao. y Mi. (ambas Sorin)	<b>ETT + ETE:</b> Prótesis mitral normofuncionante. Dehiscencia periprotésica aórtica con IAo severa.	<b>ETT:</b> Similar a previo <b>CATERETERISMO:</b> IAo masiva. Enfermedad coronaria severa de 3 vasos	2 años	Q + A	<b>ETE:</b> IAo severa por dehiscencia periprotésica	-	
8	Prot. Met. Mi. St Jude	<b>ETT:</b> Dudosa vegetación mitral, prótesis normofuncionante	<b>ETT:</b> 2 vegetaciones mitrales (11 x 0,9 cm)	1 mes	A	<b>ETT:</b> Normal	<b>ETT:</b> Dehiscencia periprotésica leve, pequeña imagen sugerente de vegetación antigua.	
9	Prot. Met. Ao. Carbomedics	-	<b>ETT:</b> IAo moderada. <b>ETE:</b> Absceso perivalvular en unión mitro-aórtica y suelo de Ao ascendente. Aneurisma perforado. Insuficiencia aórtica periprotésica moderada.	-	Q + A	<b>ETT:</b> IAo moderada, dehiscencia. Plastia mitral ligeramente estenótica.	-	
10	Prot. Biol. Ao. Carpentier	<b>ETT:</b> Velos protésicos aórticos engrosados, EAO. <b>ETE:</b> Similar a previo	<b>ETT:</b> Disfunción protésica por gradientes elevados. No se visualiza la apertura de los velos valvulares.	2 días	Q + A	<b>ETT:</b> Gradientes ligeramente elevados, IAo leve.	-	
11	Prot. Met. Mi. Carbomedics	<b>ETT:</b> Prótesis normofuncionante. <b>CATERETERISMO:</b> Disfunción protésica, mitral que se comporta como estenótica. IMi leve.	-	1 mes	Q + A	-	-	
12	Prot. Met. Ao. Björk	<b>ETT:</b> Prótesis aórtica normofuncionante. Insuficiencia periprotésica leve.	-	9 meses	Q + A	-	-	
13	Prot. Met. Ao. y Mi. (ambas Sorin)	<b>ETT:</b> Ambas prótesis normofuncionantes. <b>ETT + ETE:</b> Trombo laminar en prótesis mitral. IAo leve.	<b>ETT:</b> Prótesis mitral con gradiente elevado. 2 imágenes móviles en anillo sugerentes de trombos.	Entre 1er y 2º estudio: 16 meses. Del 2º al 3º: 12 meses.	Q + A	<b>ETT y ETE:</b> Normales	<b>ETT:</b> EMI, imágenes móviles sugerentes de trombos	
14	Prot. Met. Mi. Sorin	<b>ETT:</b> Buena movilidad de hemidiscos, pero con gradiente transvalvular aumentado	<b>ETE:</b> Inmovilidad del disco lateral por trombos en cara auricular. IMi leve. Gradientes severamente elevados	3 meses	Q + A	-	-	
15	Prot. Met. Mi. Omnicaarbon	-	<b>ETT:</b> Prótesis disfuncionante <b>ETE:</b> Dehiscencia periprotésica severa	-	Q	-	-	
16	Prot. Met. Ao. y Mi. (ambas Björk)	<b>ETE:</b> Eao moderada, IAo periprotésica moderada, IMi periprotésica moderada	-	3 meses	Q + A	-	-	

**TABLA 3. HALLAZGOS ECOCARDIOGRÁFICOS EN LAS EI PROTESICAS POR P. ACNES**

Prot: Prótesis. Met: Metálica. Biol: Biológica. Ao: Aórtica. Mi: Mitral. IAo: Insuficiencia aórtica. IMi: Insuficiencia mitral. EAO: Estenosis aórtica. EMI: Estenosis mitral. A: Antibioterapia. Q: Cirugía (recambio valvular)

#### **5.1.2.4. MICROBIOLOGÍA**

##### **5.1.2.4.1. CULTIVOS**

Durante el periodo sintomático previo al diagnóstico se extrajeron hemocultivos en 2 pacientes. En 1 de ellos se objetivó la presencia de *PA* en 1 de 6 hemocultivos, inicialmente erróneamente identificado como *Corynebacterium* (ver Tabla 4).

En el ingreso diagnóstico se extrajeron hemocultivos en 7 pacientes. Cuatro fueron positivos para *PA*, con un tiempo medio de crecimiento de 11,6 días (rango 5-21 días). En 3 fueron estériles: todos ellos estaban recibiendo tratamiento antibiótico. Se obtuvieron muestras quirúrgicas de 13 pacientes. En todas se aisló el *PA*, con un tiempo de crecimiento medio de 12,2 días (rango 5-30 días). En uno de los casos, el *PA* creció únicamente en el trombo protésico, que se cultivó de manera paralela a la prótesis. Dos muestras crecieron en siembra directa en medio de anaerobiosis, 3 en frascos de anaerobios, y 4 en otros medios de enriquecimiento. En 4 casos no se especificó el medio en el que se cultivó la válvula.

Hubo 5 recaídas en 4 pacientes, cuatro estuvieron microbiologicamente documentadas. En 2 los hemocultivos fueron positivos para *PA* y en 2 lo fueron las muestras quirúrgicas.

Los antibiogramas fueron especificados en 11 pacientes: en todos ellos el *PA* fue sensible a la penicilina. En seis casos se informó la sensibilidad para vancomicina, siendo en 5 sensible y en 1 intermedia. En 3 casos se especificó sensibilidad para clindamicina y en 2 casos para rifampicina. Uno de los casos fue resistente a metronidazol.

## RESULTADOS

CASO	PERIODO SINTOMÁTICO		INGRESO DIAGNOSTICO				RECAÍDA		
	HC	CULTIVO PRÓTESIS	HC (NºD)	CULTIVO PRÓTESIS (NºD)	PCR		HC (NºD)	CULTIVO PRÓTESIS (NºD)	
					Tipo de muestra	Resultado			
1	-	-	6/6 + PA (9º)	-	-		1	6/6 – (30)	-
							2	6/6 – (30)	+ PA (28º)
2	-	NEGATIVO	6/6 –	+ PA (7º)	PFN	Negativa	-		
3	-	-	-	+ PA	PFN	Negativa	-		
4	-	-	-	+ PA (6º)	PFN	Negativa	-		
5	-	-	1/6 + PA (5º)	+ PA (12º)	PFN	Negativa	-		
6	-	-	2/3 + PA (21º)	-	-		6/6 –	+ Staph. Auricularis + Otro (*) (21º)	
7	-	-	-	+ PA	PFN	Negativa	-		
8	1/6 + PA	-	3/3+ PA		-		5/6 + PA (12º)	NEGATIVO	
9	-	-	6/6 –	+ PA	PFN	Negativa	-		
10	-	-	-	+ PA	PFN	Negativa	-		
11	-	-	-	+ PA (14º)	PFN	Negativa	-		
12	-	-	-	+ PA (5º)	PFN	Negativa	-		
13	-	-	-	+ PA (7º)	PFN	Negativa	1/3 + PA (5º)		
14	-	-	-	PROTESIS : Negativa	TF (muestra 1)	Negativa	-		
					TF (muestra 2)	+ PA			
				TROMBO: + PA	TF	+ PA			
15	-	-	3/3 –	+ PA (30º)	TF	+ PA	-		
16	-	-	-	+ PA (7º)	-	-	-		

**TABLA 4. MICROBIOLOGÍA EN 16 EIVPPA A LO LARGO DE SU EVOLUCIÓN CLÍNICA: RESULTADOS DE HEMOCULTIVOS, CULTIVOS QUIRÚRGICOS Y PCR**

HC -: Hemocultivo estéril. NºD: Día en que se objetivó crecimiento del PA (no se dispuso del tiempo de crecimiento en todos los casos). PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. PFN: Muestra de tejido conservado en parafina. TF: Muestra de tejido en fresco. (\*) Microorganismo morfológicamente similar a *P. acnes* que finalmente no pudo ser identificado.



## RESULTADOS

### 5.1.2.4.2. BIOLOGÍA MOLECULAR: DETECCIÓN DE *P. ACNES* MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

La PCR en tiempo real no detectó la presencia de ADN de *PA* en ninguna de las muestras conservadas en parafina.

La cantidad de DNA obtenido de las muestras fijadas en parafina fue muy escasa (**ver tabla 5**), en parte debido al escaso tamaño de las muestras y por otro lado debido a la escasa calidad de las mismas, en las que el tejido conectivo era mayoritario.

PACIENTE	MUESTRA	CANTIDAD DNA (ng/μl)
2	Nº 1	14.17
	Nº 2	27.81
	Nº 3	11.54
3	Nº 1	34.83
4	Nº 1	29.10
	Nº 2	17.43
	Nº 3	23.10
5	Nº 1	20.70
	Nº 2	28.10
7	Nº 1	18.49
10	Nº 1	42.75
	Nº 2	75.15
	Nº 3	33.13
11	Nº 1	64.04
	Nº 2	69.93
12	Nº 1	23.51
13	Nº 1	31.98

**TABLA 5: CANTIDAD DE DNA EXTRAIDO DE LAS MUESTRAS FIJADAS EN PARAFINA**

## RESULTADOS

Sin embargo fue positiva en los 2 casos realizados con muestras en fresco, aunque no en todos los fragmentos (ver tabla 5) Al realizar la *melting curve* se observó una temperatura bien definida (59°C) para todas las muestras positivas excepto para 2 (Caso 14 muestras 2 y 3, ambas diluidas), que resultaron tener una temperatura de *melting* ligeramente más elevada. Estos dos resultados se consideraron positivos tardíos (**Ver Gráficos 3 y 4**)

En el caso 16 las muestras, que fueron negativas, provenían ambas de una posible recaída, que finalmente no se confirmó.

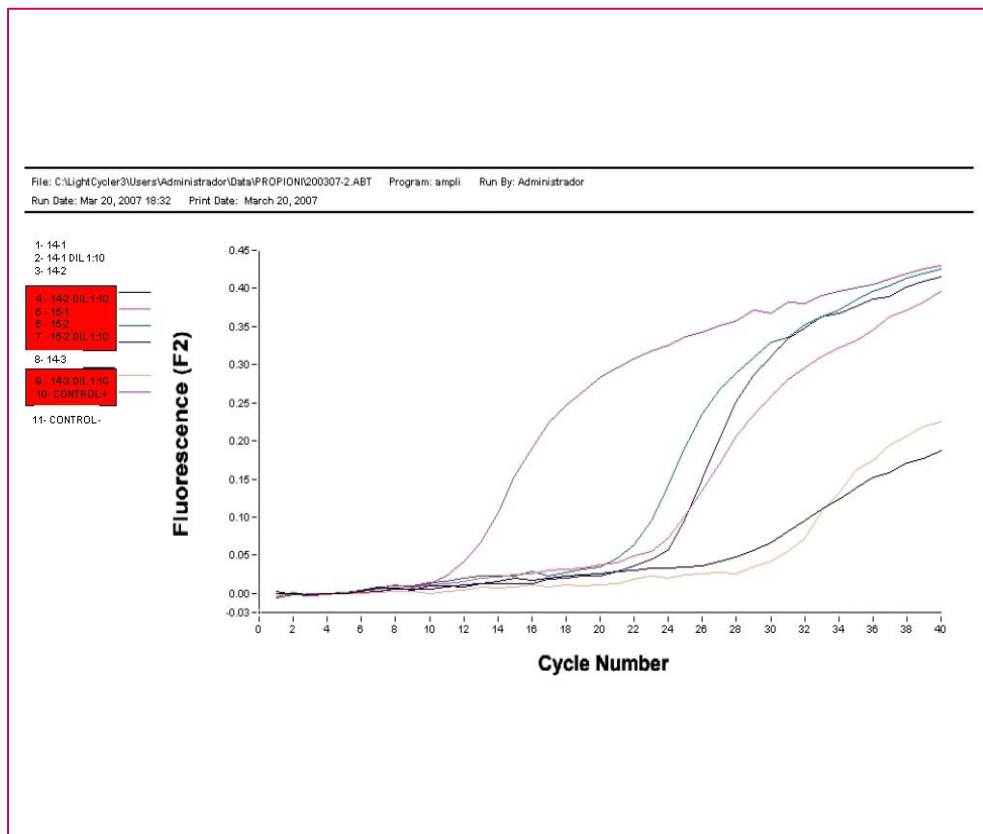


GRÁFICO 3: CURVA DE DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA

14-1: CASO 14 MUESTRA Nº1

14-1: DIL 1:10 : CASO 14 MUESTRA Nº1, PERO DILUIDA 1:10

14-2: CASO 14 MUESTRA Nº2

14-2: DIL 1:10 : CASO 14 MUESTRA Nº2, PERO DILUIDA 1:10

14-3: CASO 14 MUESTRA Nº3

14-3: DIL 1:10 CASO 14 MUESTRA Nº3, PERO DILUIDA 1:10

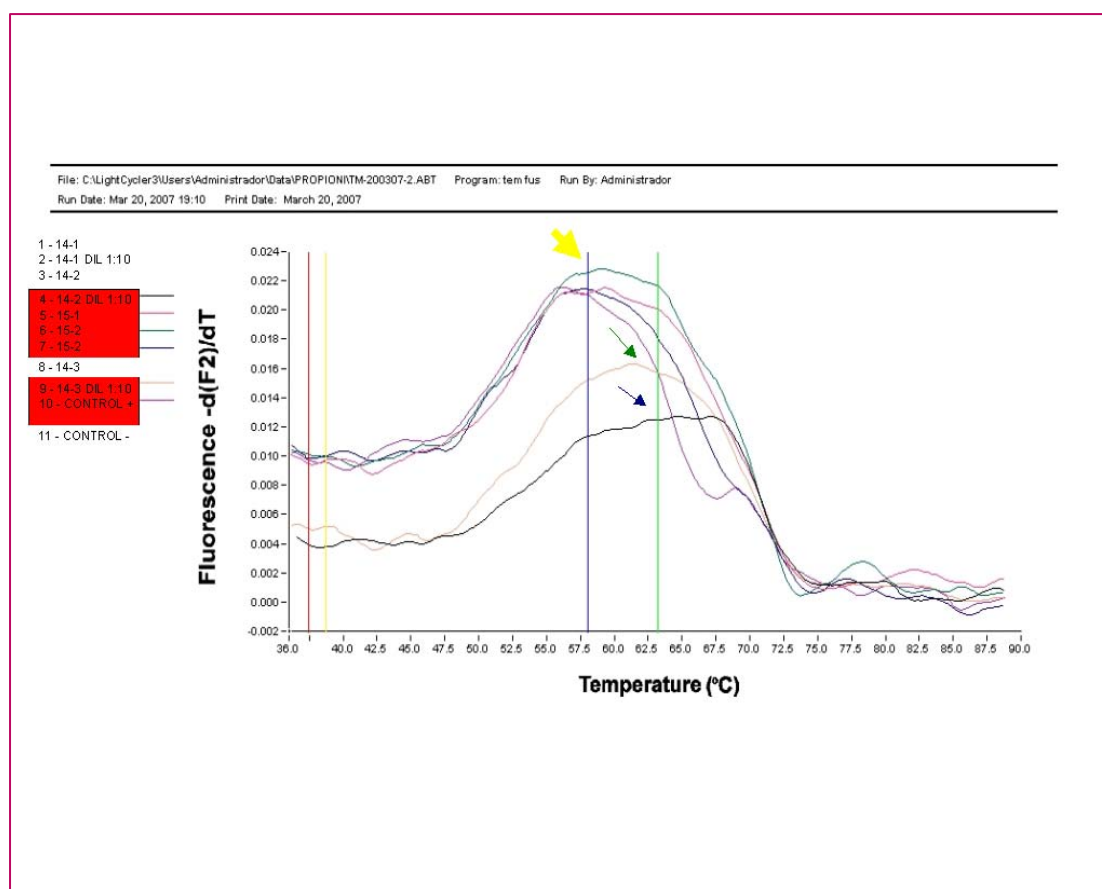
15-1: CASO 15 MUESTRA Nº1

15-2: CASO 15 MUESTRA Nº2

15-2 DIL 1:10: CASO 15 MUESTRA Nº2, PERO DILUIDA 1:10

(LAS MUESTRAS POSITIVAS SE HAN ENCUADRADO EN ROJO)

## RESULTADOS



**GRÁFICO 4:**

### MELTING CURVE DE LAS MUESTRAS POSITIVAS

- Temperatura de la mayoría de las muestras (59°C)
- Temperatura de los positivos tardíos
-

### **5.1.2.5. TRATAMIENTO Y EVOLUCIÓN**

Inicialmente 18.7% de los pacientes recibieron sólo tratamiento antibiótico, 75% antibioterapia mas cirugía. Uno recibió únicamente cirugía, ya que el diagnóstico se hizo postmortem (**ver figura 5**).

Tras el tratamiento médico o quirúrgico se apreció una defervescencia de la fiebre en las primeras 2 semanas de tratamiento en todos los pacientes; en un paciente desaparecieron las áreas de necrosis cutánea y la proteinuria.

Los antibióticos utilizados fueron penicilinas (40%), cefalosporinas de 3ª generación (26.6%) - , vancomicina en monoterapia (6.6%) o en combinación con aminoglucósidos (20%), u otros antibióticos (6.6%). La duración del tratamiento parenteral fue  $\geq 6$  semanas (**ver tabla 6**).

Se prescribió además tratamiento oral supresor (TOS) con amoxicilina en 2 pacientes que no habían sido operados, en 2 en los que la limpieza quirúrgica fue incompleta persistiendo material protésico y en 3 en los que la antibioterapia no se había iniciado inmediatamente después de la sustitución valvular (**ver figura 6**). El antibiótico utilizado, las dosis y la duración se muestran en la figura 6. Dos pacientes que no cumplieron adecuadamente el TOS recayeron, pero también recayó uno con cumplimiento adecuado.

El 58.3% de los pacientes que recibieron tratamiento combinado evolucionaron favorablemente, 8.3% recayó, y 33.3% presentaron dehiscencia precoz - uno finalmente precisó trasplante cardiaco. Las dehiscencias

## RESULTADOS

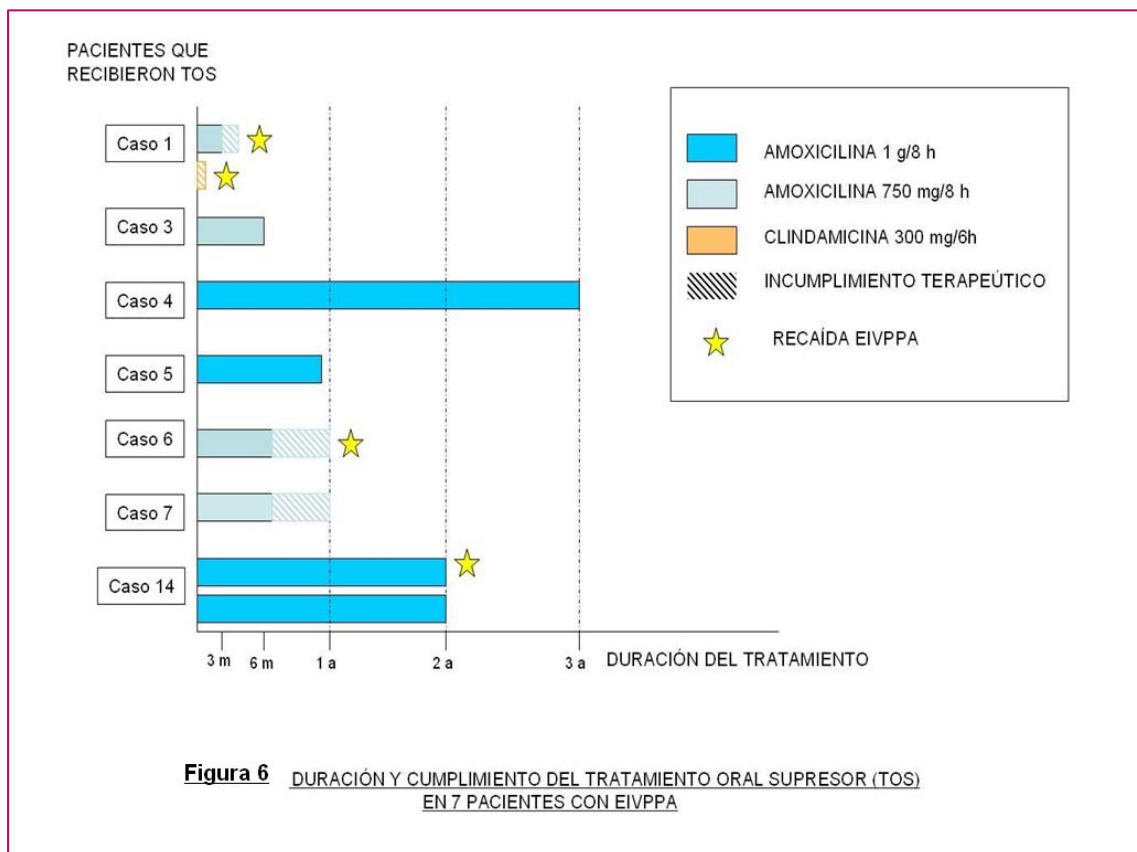
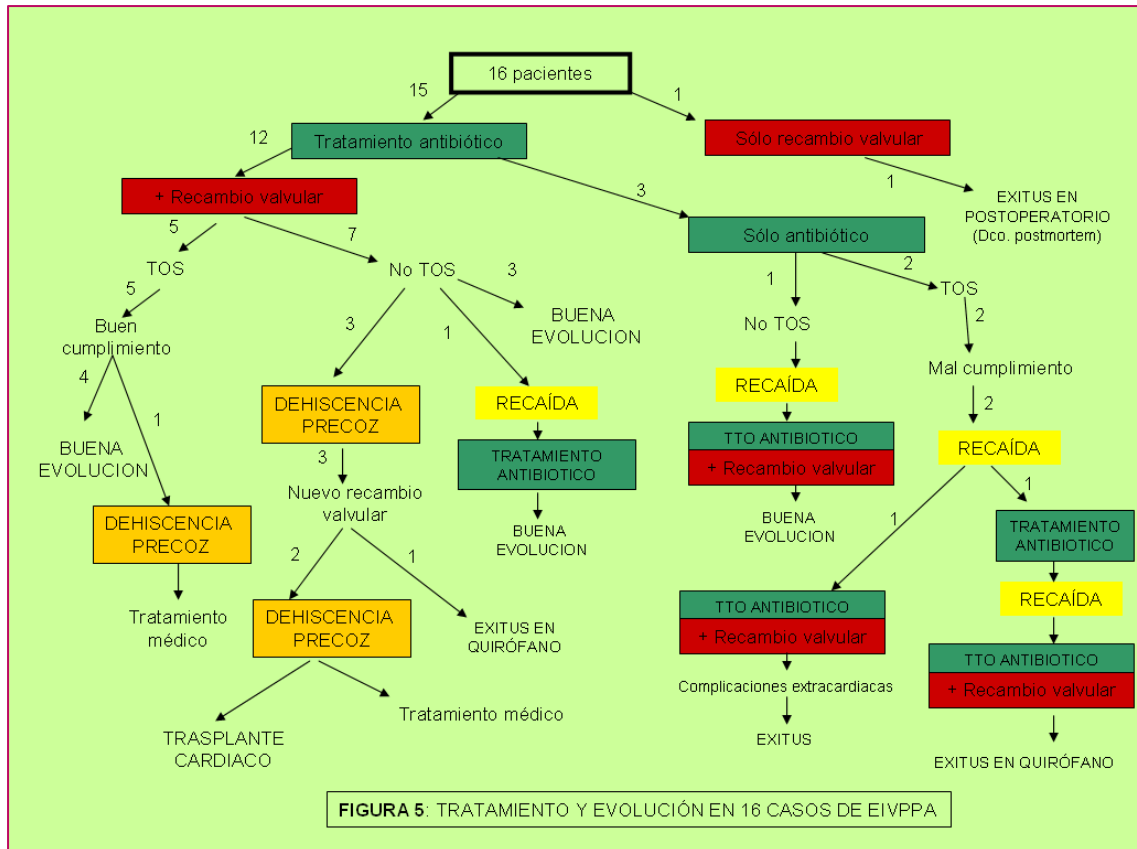
protésicas ocurrieron entre la 5ª semana y el 8º mes del recambio valvular. Tres de ellos fueron sometidos de nuevo a recambio protésico, falleciendo uno en el acto quirúrgico, mientras que los otros dos presentaron nuevamente dehiscencia protésica. En ninguna de estos episodios pudo confirmarse la presencia de endocarditis por ser los cultivos negativos y la histología no concluyente.

La indicación quirúrgica más frecuente fue la disfunción protésica con insuficiencia cardíaca (69%). En uno de ellos existía una segunda indicación. En 4 pacientes (30%) la indicación fue por disfunción sin insuficiencia cardíaca, coexistiendo en 3 de ellos una segunda indicación

El 100% de los pacientes que, inicialmente, sólo habían recibido antibioterapia fue finalmente intervenido por recaída (**ver figura 5**). Un paciente desarrolló insuficiencia renal progresiva con anticuerpos anticardiolipina positivos y biopsia inespecífica precisando diálisis. La mortalidad relacionada con la endocarditis fue de un 18.7%.

El seguimiento en consultas externas fue de 1 año en 1 paciente, entre 2 y 5 años en 6 pacientes y más de 5 años en 2 pacientes. 7 pacientes no tuvieron seguimiento, 2 por éxitus en el postoperatorio tardío, 3 por traslado a sus centros de origen y 2 por ser pacientes de otros centros.

## RESULTADOS



## RESULTADOS

	TRATAMIENTO				EVOLUCIÓN	
	TTO 1º	ANTIBIOTICO	TIEMPO (s)	INDICACIÓN QUIRÚRGICA	SINTOMAS	COMPLICACIONES
1	A	VANCOMICINA GENTAMICINA AMOXI.CLAVUL.	6	-	Desaparece fiebre al 3er d 2ª recaída: Decrece el aneurisma la 1ª semana	Exitus en la 2ª recaída
2	A	VANCOMICINA GENTAMICINA RIFAMPICINA	5	Disfunción protésica + Absceso	Desaparece fiebre la 2º s Persistencia de BAV	Dehiscencia protésica aguda (a las 5 s) Exitus en quirófano.
3	Q	VANCOMICINA PENICILINA	1 4	Disfunción protésica ICC	-	-
4	Q	CEFTRIAXONA TEICOPLANINA	6	Disfunción protésica ICC	-	-
5	Q	CEFTRIAXONA	6	Disfunción protésica ICC	-	-
6	A	VANCOMICINA RIFAMPICINA OFLOXACINO DOXICICLINA PENICILINA	3 4 12 12 3	-	Desaparece fiebre la 1ª s Mejoría de lesiones cutáneas, las áreas de necrosis y la disnea	-
7	Q	VANCOMICINA GENTAMICINA CEFTRIAXONA PENICILINA	2 2 3 6	Disfunción protésica ICC	Desaparece fiebre Mejora la ICC	Dehiscencia protésica aguda (a las 5 s)
8	A	AMPICILINA GENTAMICINA CLOXACILINA	6 4 2	-	Desaparición de las vegetaciones	Anemia severa.
9	Q	VANCOMICINA CIPROFLOXACINO	6 2	Disfunción protésica Absceso	-	Nefrotoxicidad Dehiscencia protésica aguda (a los 8 m)
10	Q	PENICILINA G	6	Disfunción protésica Embolismo único	-	Epididimitis
11	Q	PENICILINA G	6	Disfunción protésica	-	-
12	Q	PENICILINA G	6	ICC	-	-
13	Q	CEFTRIAXONA	6	Embolismo recurrente, ICC	-	-
14	Q	PIPERACILINA-TAZOBACTAM CIPROFLOXACINO CEFOTAXIMA	4	Disfunción protésica ICC	-	-
15	Q	-	-	Disfunción protésica ICC	-	Exitus en postoperatorio inmediato
16	Q	VANCOMICINA	6	Disfunción protésica ICC	-	-

**TABLA 6. ANTIBIOTERAPIA, INDICACIÓN QUIRÚRGICA Y EVOLUCIÓN DURANTE EL INGRESO EN 16 EI PROTÉSICAS POR P. ACNES**

A: Tratamiento antibiótico. Q: Cirugía de sustitución valvular. ICC: Insuficiencia cardíaca congestiva. s: Semanas. d: Días. m: Meses.

#### **5.1.2.6. DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA**

Macroscópicamente, los hallazgos más frecuentes fueron la presencia de abundante pannus grisáceo friable (43,7%) y la desinserción de la prótesis por dehiscencia de las suturas (31,2%). Otros a destacar fueron: presencia de signos inflamatorios periprotésicos (25%), pseudoendotelización parcial de la prótesis (7%), apariencia friable del tejido periprotésico (12,5%), y trombo de aspecto antiguo (18,7%). La presencia de vegetaciones (7%) o abscesos (7%) fue infrecuente (**ver tabla 7**).

En 1 de los casos se mencionó la existencia de un tejido rojizo adherido al anillo. Posteriormente se confirmó la presencia de metalosis mediante el estudio anatomopatológico (ver más adelante).

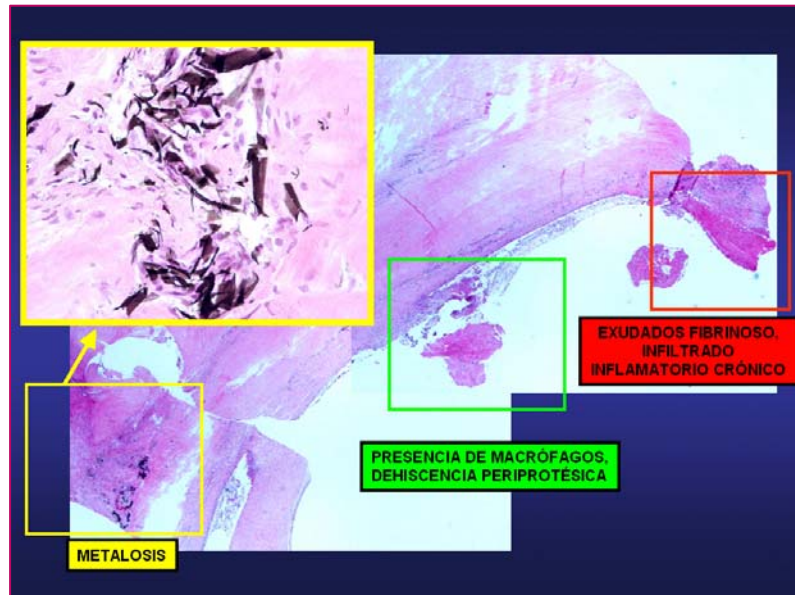
No se encontraron datos macroscópicos claramente distintivos entre las diferentes prótesis, aunque en 3 de las 5 prótesis Sorin visualizadas se apreciaba la presencia de trombosis. La presencia o el aspecto del pannus fue similar para todos los modelos de prótesis.



### **5.12.7. HISTOLOGÍA**

Histológicamente se objetivó: granuloma de cuerpo extraño (71,4%), exudado fibrinoso (57,1%), trombos en distintas fases de organización (42,8%), signos inflamatorios crónicos (35,7%), presencia de signos de actividad aguda (14,3%), sutura no organizada (21,4%), depósitos de calcio (21,4%), neoangiogénesis (14,3%) (**ver tabla 7**). En ninguna de las muestras se observaron colonias bacterianas.

En 2 casos se observó la presencia de metalosis, morfológicamente descrito como material negruzco incrustado en el anillo perianular o bien tatuado en este tejido, con aspecto de material no orgánico (**ver foto1**). Ambas prótesis se trataban de prótesis Carbomédics, en situación mitral.



**FOTO 1: TINCIÓN DE HEMATOXILINA - EOSINA SOBRE FRAGMENTO DE TEJIDO PERIPROTÉSICO, DETALLE DE LOS DISTINTOS HALLAZGOS ENCONTRADOS Y, EN MAYOR AUMENTO, METALOSIS PERIANULAR.**

Caso	Prótesis (1ª Y 2ª cirugía)	ASPECTO MACROSCÓPICO EN QUIRÓFANO	DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA
1	SJAo + TV	Pared arterial parduzca, de consistencia blanda. Coágulo en porción distal de tubo aórtico.	Abundante fibrina, trombosis. Erosiones de la íntima y focos de necrosis. Signos morfológicos de endocarditis tanto en prótesis como en el tubo valvulado.
2	BAo	(no descrito)	Bioprótesis con lesiones degenerativas asociada a perforaciones valvulares
	BCAo	Abscesos y material friable perianular. Dehiscencia de suturas.	Fibrina sobre anillo protésico en distintas fases de organización, sugente de trombo no inflamatorio. Sutura no organizada. No actividad aguda. No colonias
3	CMMi	Abundante pannus que produce estenosis y distensión protésica	Fibrosis del anillo valvular asociado a inflamación crónica. Granulomas de cuerpo extraño frente a material tatuado negrozco. Exudado fibrinoso. Trombo sobre prótesis valvular.
4	OCMi + OCAo	Abundante pannus perivalvular an ambas válvulas	Ao: Tejido fibroso anular y perianular con inflamación crónica, granulomas de cuerpo extraño, microcalcificaciones y neoangiogénesis. Mi: Tejido fibroso perianular con microcalcificaciones y neoangiogénesis
5	BAo	Pannus en ánulo	Tejido perianular con fibrosis y granulomas de cuerpo extraño. Lesiones degenerativas. depósitos de colesterol y microdisecciones en velos protésicos
6	CMAo	( no descrito)	Material de sutura, con depósito de fibrina y reacción de cuerpo extraño. Sutura no organizada.
7	SOMi + SOAo	Abundante pannus en ambas válvulas. Prótesis aórtica desinsertda parcialmente del ánulo	Sutura no organizada. Abundante fibrina. Material sintético con reacción de cuerpo extraño.
8	SJMi	Signos de endocarditis a nivel de anillo posterior mitral	(no descrito)
	CMAo	(no descrito)	(no descrito)
9	BCAo	Dehiscencia subtotal de la prótesis con signos macroscópicos de infección reciente, restos necróticos y estafelcos	(no descrito)
10	BAo	Fibrosis de los velos de valva anterior, reacción inflamatoria y restricción de su apertura.	Trombo sin reacción inflamatoria
11	CMMi	Abundante pannus en prótesis mitral. Tejido rojizo adherido al anillo de la prótesis. Prótesis muy incrustada en el anillo, que protruye hacia el anillo.	Fragmento de anillo de tejido fibroso, con incrustaciones de material negrozco y reacción de cuerpo extraño. Material trombótico en diferentes fases de organización.
12	BjAo	Prótesis aórtica bien pseudoendotelizada. Pannus abundante grisáceo subaórtico.	Anillo valvular con fibrosis, inflamación y granulomas de cuerpo extraño asociado a exudado fibrinoso.
13	SOMi + SOAo	Prót. aórtica con trombo de aspecto envejecido. Prótesis mitral con abundante pannus grisáceo en cara auricular. Pseudoendotelización parcial. Trombo auricular de aspecto antiguo	Ao: tejido conectivo fibroso con inflamación crónica inespecífica y granulomas de cuerpo extraño. Material fibrinoso en diferentes fases de evolución. Mi: Granuloma de cuerpo extraño, tejido conectivo fibroso con zonas de actividad aguda (exudado fibrinoso y neutrófilos) y con inflamación crónica. Material trombótico en diferentes fases de evolución.
14	SOMi	Pannus y trombosis de las ¾ partes de la prótesis	Trombo con signos morfológicos de endocarditis
15	OCMi	Dehiscencia protésica de ¼ del anillo, sin pannus ni trombos	Tejido periprotésico con granuloma de cuerpo extraño frente a material de sutura
	BjMi + BjAo	Abundante pannus en prótesis aórtica y mitral, adherencias abundantes	Ao: Tejido conectivo periprotésico con fibrosis reactiva, calcificación distrófica y ligera inflamación crónica
16	CMMi + CMMO	Vegetaciones en prótesis mitral, desinserción de la válvula mitral, inflamación y adherencias masivas.	Mi: Exudado fibrinoso organizado.

TABLA 7: HALLAZGOS MACROSCÓPICOS E HISTOLÓGICOS EN 16 EIVPPA, EN TODAS LAS CIRUGÍAS

SJAo: Prótesis metálica St Jude aórtica. SJMi: Prótesis metálica St Jude mitral. TV: Tubo valvulado. BAo: Prótesis biológica aórtica. BCAo: Prótesis metálica Bicarbon aórtica . CMAo: Prótesis metálica Carbomédica aórtica. CMMi: Prótesis metálica Carbomédica Mitral. OCAo: Prótesis metálica Omnicarbon aórtica .OCMi: Prótesis metálica Omnicarbon Mitral. SOAo: Prótesis metálica Sorin aórtica. SOMi: Prótesis metálica Sorin mitral. BjAo: Prótesis metálica Björj aórtica. BjMi: Prótesis metálica Björj mitral.

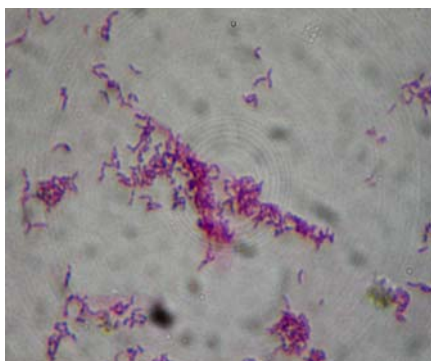
## **5.2. INVESTIGACIÓN BÁSICA**

### **5.2.1. LA BIOCAPA DEL *PROPIONIBACTERIUM ACNES***

#### **5.2.1.1.- DESARROLLO Y OBTENCIÓN DE BIOCAPA**

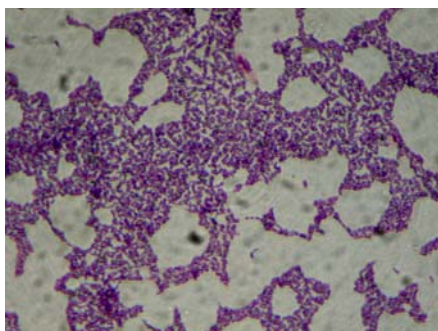
En las tinciones de Gram de los cultivos de las improntas valvulares en placa y del tioglicolato, los *PA* se tiñeron como bacilos Gram positivos, en ocasiones gram-variables según la intensidad de la tinción. Mostraron agregaciones distintas, en función del medio de cultivo. En las muestras en medio líquido (tioglicolato) los bacilos tendían a agregarse en pequeños grupos, a veces grandes, pero con tendencia a formar disposiciones aracneiformes. Clásicamente se ha descrito que estos microorganismos pueden presentarse individualmente, en parejas en forma de “V” o “Y”, en cadenas cortas o agrupadas formando un patrón en letras chinas. Pero en las muestras obtenidas en medio sólido, la apariencia era más trabecular, lo que podría reflejar que cuando se improntaron, dichas colonias se encontraban embebidas dentro de una matriz en la superficie de la prótesis (**ver fotos 2-5**).

## RESULTADOS



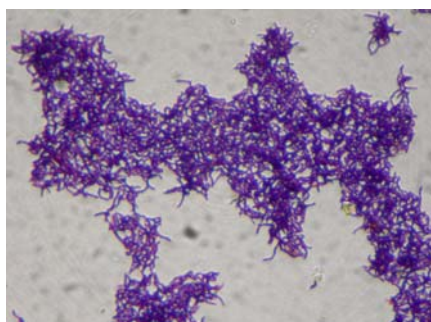
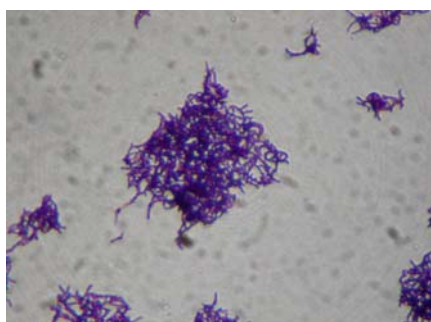
**FOTO 2:** Tinción de Gram de *PA* a partir de cultivo en medio líquido (tioglicolato).

Imagen obtenida con microscopio óptico con aumento 100x con inmersión en aceite.



**FOTO 3:** Tinción de Gram de *PA* a partir de impronta de válvula en placa de agar-chocolate.

Imagen obtenida con microscopio óptico con aumento 100x con inmersión en aceite.



**FOTOS 4 Y 5:** Tinción de Gram de *PA* a partir de cultivo directo de la cepa en placa de agar-sangre anaeróbica.

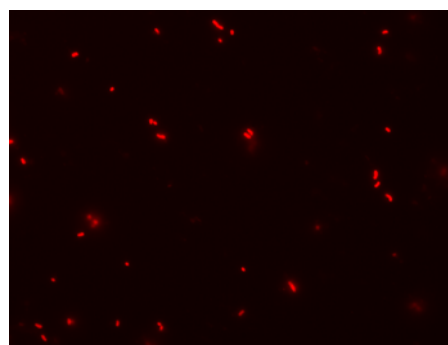
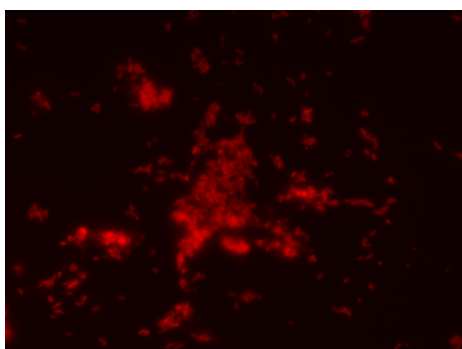
Imágenes obtenidas con microscopio óptico con aumento 100x con inmersión en aceite.

### **5.2.1.2. VISUALIZACIÓN DE LA BIOCAPA DE PROPIONIBACTERIUM ACNES**

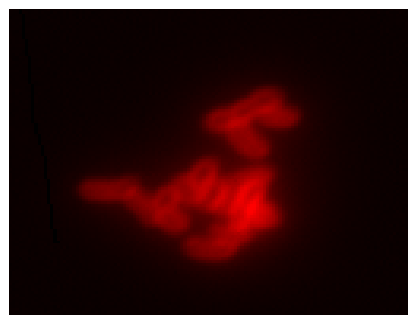
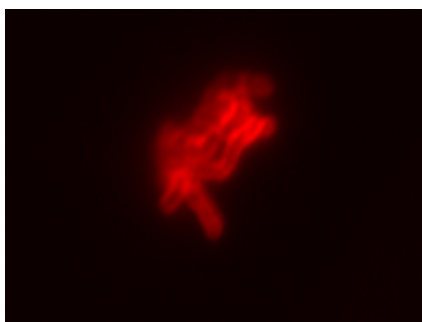
#### **5.2.1.2.1. TINCIÓN CON ANTICUERPOS MONOCLONALES**

##### **A. MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA**

Tras la tinción con el anticuerpo monoclonal QUBPa3, en la microscopía de inmunofluorescencia *PA* se presentaba como un bacilo, con captación homogénea del anticuerpo en toda su superficie. Formaba, por lo general, casi siempre grupos, con importantes variaciones en el tamaño de los mismos según las muestras (**ver fotos 6-9**).



**FOTOS 6 Y 7:** Microscopía de fluorescencia de *PA* teñido con QUBPa3. Objeto de 65 aumentos.



**FOTOS 8 Y 9:** Microscopía de fluorescencia de *PA* teñido con QUBPa3. Objeto de 100 aumentos con inmersión en aceite más un aumento adicional de 1,6x

## RESULTADOS

El conteo de las bacterias por campo de las muestras arrojó datos similares para todos los tipos de válvula y cepa, en contra de lo que parecía a simple vista. Sólo hubo un tipo de válvula y cepa que mostró una mayor población bacteriana (cepa 156052, válvula Carbomédics) (ver **tabla 8**) pero esta diferencia poblacional no fue confirmada por lectura de densidad óptica con longitud de onda de 550 y 620 nm, que arrojaba datos similares para todos los experimentos.

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la población bacteriana adherida a válvulas con teflón y las que no lo tenían.

Cepa	Numero cepa	Tipo de válvula	Media nº bacterias/campo
1	146450	Sorin con teflón	39,6
		Sorin sin teflón	20
		Carbomedics sin teflón	29
		St Jude sin teflón	44,6
2	156052	Sorin con teflón	30,2
		Carbomedics sin teflón	325
		St Jude sin teflón	10
3	166545	Carbomedics sin teflón	37
		St Jude sin teflón	20
		Sorin con teflón	23.5
4	166795	Sorin con teflón	10

**TABLA 8 : CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS POR CAMPO SEGÚN CEPA Y TIPO DE PRÓTESIS EN 11 EXPERIMENTOS**



### B. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL

Las muestras de mayor calidad fueron examinadas con el microscopio confocal. Se apreciaron claramente agregados bacterianos formando estructuras con espesores que oscilaban entre 6,31  $\mu\text{m}$  y 19,9  $\mu\text{m}$  en la muestra más abundante. La estructura de estos grupos bacterianos aparentaba ser homogénea, con distintas alturas según el punto analizado, y con estructuras semejantes a “hongos” delimitados por canales, tal y como se describe en las publicaciones clásicas de biocapa (**Fotos 10-14**).

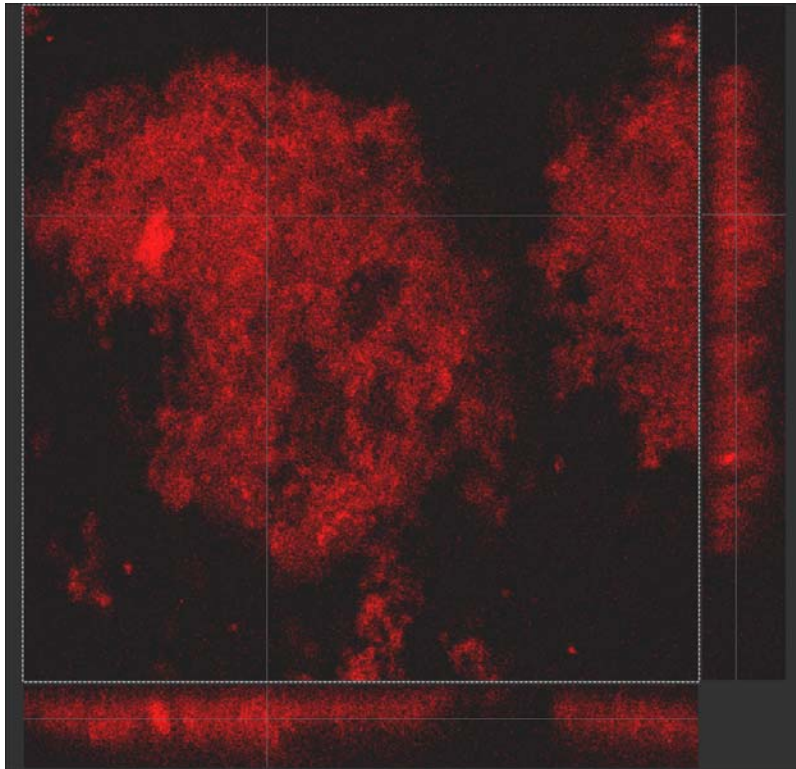
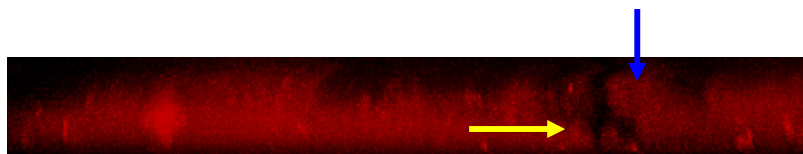
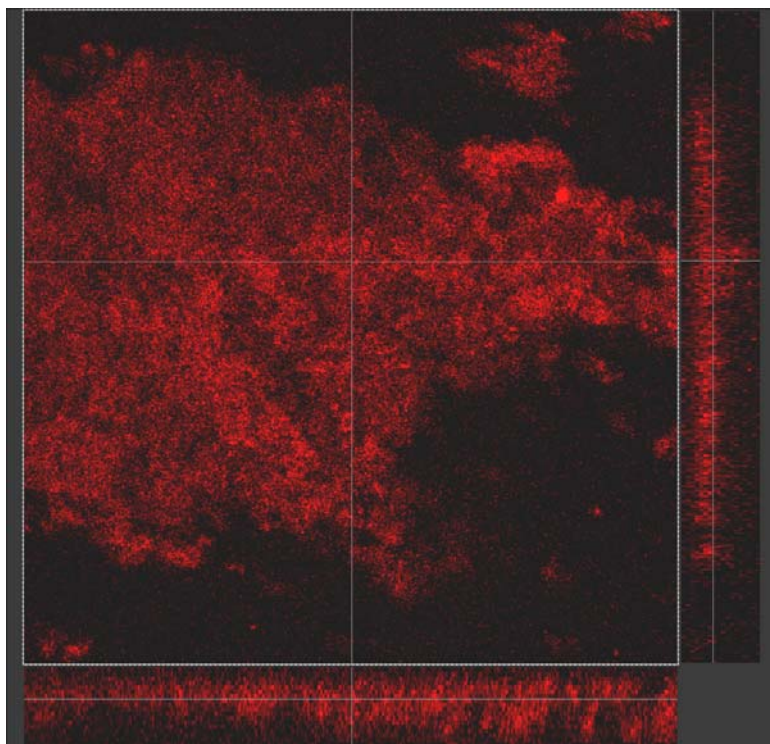


FOTO 10: Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal que muestran los planos perpendiculares xy-, xz-, e yz- de una muestra de biocapa formada sobre válvula Carbomedics. Profundidad: 19,94  $\mu\text{m}$ . Muestra: cepa 156052. Objetivo de 40 aumentos.

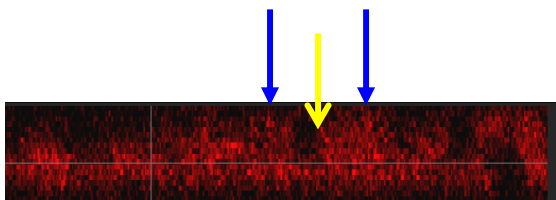


## RESULTADOS

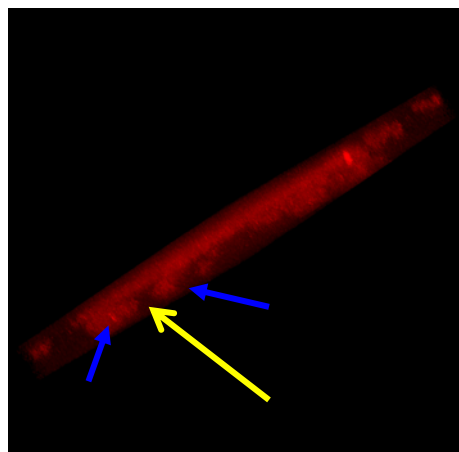
**FOTO 11:** Detalle de proyección en el plano xz- de la muestra anterior, se observa la existencia de canales como parte de la estructura tridimensional de la biocapa (flecha amarilla) y estructuras tipo hongo junto a ellos (flecha azul)



**FOTO 12:** Imágenes obtenidas por microscopia láser confocal que muestran los planos perpendiculares xy-, xz-, e yz- de una muestra de biocapa formada sobre válvula Carbomedics. Objetivo de 40 aumentos. Profundidad: 16,7  $\mu\text{m}$ . Muestra: cepa 156052



**FOTO 13:** Detalle de proyección en el plano xz- de la muestra anterior, Canales (flecha amarilla) y estructuras tipo hongo junto a ellos (flechas azules)



**FOTO 14:** Proyección oblicua del plano en el plano xz- de la muestra anterior. Canales (flecha amarilla) y estructuras tipo hongo junto a ellos (flechas azules).



#### 5.2.1.2.2. TINCIÓN CON CALCOFLUOR

La tinción con calcoflúor de la matriz de polisacáridos produjo resultados muy heterogéneos. En algunas muestras se apreció una captación sobre las bacterias, muy irregular y débil que podría corresponder a dicha matriz. En otras apenas se apreciaba tinción alguna. Hubo muestras por último en las que la fluorescencia fue tan intensa que se consideró un artefacto. Se probaron distintas concentraciones del calcoflúor, siguiendo los procedimientos descritos en otros artículos <sup>(91, 107-110)</sup>, fundamentalmente con diferentes concentraciones, y tiempos de tinción, sin que se encontraran imágenes claramente concluyentes.

#### 5.2.2. LOS BIOTIPOS DEL *PROPIONIBACTERIUM ACNES*.

Se objetivó que las cepas 166545 y 165948 mostraban con el anticuerpo monoclonal QUBPa1 el típico patrón de inmunofluorescencia descrito en la literatura, con mayor intensidad del marcaje en el ápex y en los tabiques de la pared bacteriana (ver **tabla 9**), por lo que correspondieron al biotipo I. La cepa 146450 también mostraba una captación típica con éste anticuerpo, y con la tinción con QUBPa2 una captación irregular, por lo que se concluye que esta cepa también correspondía, según la inmunofluorescencia, al biotipo I.

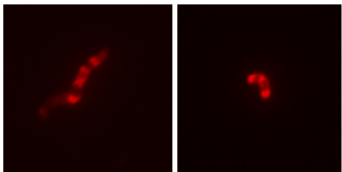
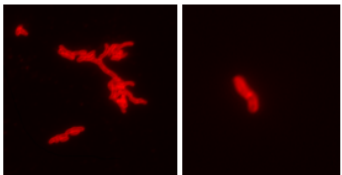
Las cepas 156052, 166795, 165980 mostraban con el anticuerpo QUBPa2 una fijación uniforme a lo largo de toda la pared bacteriana, correspondiente al biotipo II.

No pudo definirse con claridad el biotipo de la cepa 166545 porque la captación con ambos tipos de anticuerpos era similar.

Los 3 pacientes afectados con la cepa de biotipo II tuvieron eventos embólicos: 2 neurológicos y 1 coronario.

## RESULTADOS

N° CEPA	PACIENTE CORRESPONDIENTE	PATRON DE INMUNOFLUORESCENCIA		BIOTIPO
		QUBPa1	QUBPa2	
<b>146450</b>	4	TÍPICO QUBPA1	ATÍPICO QUBPA2	Tipo I
<b>156052</b>	10	NO TINCION	TÍPICO QUBPA2	Tipo II
<b>166545</b>	12	TÍPICO QUBPA1	TÍPICO QUBPA2	Dudoso
<b>166795</b>	13	NO TINCION	TÍPICO QUBPA2	Tipo II
<b>165948</b>	14	TÍPICO QUBPA1	NO TINCION	Tipo I
<b>165980</b>	15	NO TINCION	TÍPICO QUBPA2	Tipo II

MUESTRAS DE PATRONES DE INMUNOFLUORESCENCIA CON LAS TINCIONES CON QUBPa1 Y QUBPa2		
		TINCION TIPICA DE <b>QUBPa1</b>
		TINCION TIPICA DE <b>QUBPa2</b>

**TABLA 9: PATRÓN DE FLUORESCENCIA EN 6 CEPAS DE *P. ACNES* PRODUCTORAS DE  
ENDOCARDITIS**

### **5.2.3. DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN VEGF EN SANGRE PERIFÉRICA DE LOS PACIENTES CON EIVPPA.**

Los resultados del análisis del polimorfismo del gen VEGF están reflejados en la **tabla 10**. Algunos de los datos no fueron valorables por dificultades técnicas.

El polimorfismo predominante del gen 2578 del VEGF en los pacientes estudiados fue el A/C, para el gen 1154 fue el G/A y para el gen 634 fue el G/C.

PACIENTE	VEGF 2578	VEGF 1154	VEGF 634
4	A/C	A/A	G/C
5	A/A	A/G	G/G
8	A/C	G/G	G/C
9	A/A	A/G	G/G
10	A/C	X	G/C
12	A/C	A/G	G/C
13	X	X	G/G
14	X	X	X
16	C/C	A/G	G/C

TABLA 10: DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN VEGF EN SANGRE PERIFÉRICA EN 9 PACIENTES CON EIVPPA  
( X: Resultado no valorable)

# DISCUSIÓN

---

# **DISCUSIÓN SOBRE LA INVESTIGACIÓN**

## **CLÍNICA**

### **EPIDEMIOLOGÍA**

En relación con la literatura, el tamaño muestral de la presente serie es mayor, y pasaría a representar el 44% de los casos de EIVPPA

La incidencia de la EIVPPA en el Hospital de La Princesa fue de 1 caso/año, tasa similar a la descrita en otros centros <sup>(33)</sup>. Uno de los hechos que podría explicar esta frecuencia elevada en un único centro hospitalario es la existencia de un grupo de estudio de endocarditis multidisciplinario compuesto por infectólogos, cirujanos, microbiólogos y anatomopatólogos que colaboran en el manejo y diagnóstico de éstos pacientes. Desde el primer caso de EIVPPA que fue descrito en el centro, se intensificaron los esfuerzos por todos los miembros para reconocer esta enfermedad. Es posible que en centros donde esta coordinación no se haya alcanzado, el número real de episodios de EIVPPA esté siendo infradiagnosticado.

Los casos ocurrieron mayoritariamente en varones (81%), poniendo de manifiesto lo ya encontrado en otras series generales <sup>(111, 112)</sup> y de EIVPPA (88%) que muestran una mayor predisposición de los varones a padecer endocarditis infecciosa protésica.

## DISCUSIÓN

La edad media de los pacientes (59 años, mediana 55) fue similar a la recogida en la literatura (55 años, mediana 52); comparado con la edad media de los pacientes con EI protésica estas cifras son inferiores, ya que en la mayoría de los estudios la endocarditis protésica es más frecuente en los ancianos <sup>(113)</sup>.

La localización más común de la EIVPPA fue sobre válvula aórtica, y el tipo de válvula fue mayoritariamente metálica, al igual que en los casos descritos en la literatura. Este hecho podría deberse al mayor número de válvulas áorticas y metálicas que se implantan

La presencia de comorbilidad en los pacientes de este trabajo fue frecuente, resaltando la presencia de IRC, aunque en todos los casos fue leve-moderada por lo que no era esperable un aumento de la susceptibilidad a las infecciones bacterianas. Como ya se comentó, previamente, sólo se menciona la existencia de comorbilidad en dos pacientes con EIVPPA y ésta fue la presencia de diabetes mellitus <sup>(31,37)</sup>.

La existencia en 4 de nuestros pacientes del antecedente en la juventud de un acné severo podría correlacionarse con una predisposición a la infección por *PA*, o a una mayor reacción inflamatoria frente a este microorganismo. Se ha descrito que en pacientes con acné severo se encuentran títulos de anticuerpos frente a *PA* significativamente mayores que en pacientes con grados menores de enfermedad o individuos sanos <sup>(114, 115)</sup>, y que dichos títulos se mantienen al mismo nivel durante años <sup>(114)</sup>. Se ha postulado que estos individuos podrían presentar por este motivo una hipersensibilidad inmune que les provocaría, en

el seno de una nueva infección por *PA*, una respuesta inflamatoria desmesurada <sup>(116)</sup>. Hay que destacar un caso de la literatura en el que se hace mención a la presencia de acné conglobata severo en el momento del diagnóstico de la EI, aunque este caso fue sobre una anuloplastia mitral <sup>(29)</sup>.

El 95% de los casos descritos en la literatura corresponden a endocarditis protésicas tardías, mientras que en nuestro centro el porcentaje de las tardías fue sólo ligeramente superior a la de la precoz (EPP) (<1 año). También en las infecciones protésicas articulares otros autores han observado una alta tasa de infecciones tardías <sup>(117)</sup>.

En la literatura se ha relacionado, mayoritariamente, como factor de riesgo para la EIVPPA, la cirugía cardíaca previa <sup>(14, 15, 21, 26)</sup>. El presente estudio sugiere que en la endocarditis precoz (< 1 año de la cirugía) el factor de riesgo es la cirugía cardíaca previa. Se ha descrito la bacteriemia por *PA* en el curso de cirugías con circulación extracorpórea. Un trabajo mostró que en el 37% de los pacientes que recibieron profilaxis convencional perioperatoria con flucloxacilina y tobramicina, se aisló *Propionibacterium* del circuito de sangre extracorpórea al final de la operación, siendo esta tasa inferior (2%) cuando la profilaxis se realizó con teicoplanina <sup>(118)</sup>. Es probable que los procedimientos de asepsia cutánea previos a una intervención no sean capaces de eliminar completamente el *PA*, por su ubicación profunda en los folículos pilosos, presentes en el tórax.

Sin embargo, todas las endocarditis protésicas tardías estuvieron muy alejadas de la implantación y siempre precedidas de una manipulación de piel o mucosas, nichos ecológicos del *PA*. Su mecanismo de infección parece haber sido, en estos casos, secundaria a una bacteriemia.

Sólo en 2 de los casos de EIVPPA tardía se hace referencia a posibles factores de riesgo: herida por pinchazo en dedo <sup>(9)</sup> y pericardiocentesis por derrame pericárdico con cultivo positivo para *Propionibacterium* <sup>(34)</sup>. En tres casos se insiste en que la posible puerta de entrada fue buscada, sin éxito <sup>(21, 40)</sup>. Hay otras dos publicaciones en las se describen como factores de riesgo una herida en un dedo junto a un procedimiento de pericardiocentesis <sup>(32)</sup> y un procedimiento de acupuntura <sup>(11)</sup>.

Uno de los casos de nuestra serie inició los síntomas de endocarditis después de la realización de mesoterapia. Este procedimiento, a semejanza de la acupuntura, se basa en la multiinyección intradérmica. Se han descrito casos de endocarditis bacteriana subaguda tras tratamientos de acupuntura <sup>(119, 120, 121)</sup>. Los tratamientos de más riesgo son los que emplean agujas semipermanentes en las orejas. Este hecho ha llevado a numerosos autores a aconsejar que en pacientes portadores de prótesis cardiacas se eviten este tipo de terapias, y de llevarse a cabo, recomiendan en cualquier caso antibioterapia profiláctica. <sup>(121)</sup>.

El resto de publicaciones, en los que mencionan la puerta de entrada del microorganismo, son de endocarditis sobre válvula nativa, o sobre otros dispositivos intracardiacos. En todas, también, se describe una manipulación



de piel o mucosas: infecciones otorrinolaringológicas de repetición 3<sup>(8,32)</sup>, múltiples recambios de marcapasos 3<sup>(28,32, 38)</sup>, punción percutánea por seroma en bolsa del desfibrilador 1<sup>(32)</sup>, procedimientos quirúrgicos 2 - bypass femoropoplíteo 1<sup>(33)</sup> y trasplante hepático 1<sup>(24)</sup> -.

El tiempo transcurrido entre la manipulación y el inicio de los síntomas puede ser muy largo, por lo que ésta puede pasar desapercibida.

### CLÍNICA

El retraso diagnóstico, fue mayor que el habitual en las endocarditis protésicas, algo descrito en otras publicaciones, donde fue generalmente <3 meses, aunque llegó a alcanzar 23 meses<sup>(15, 21, 22, 27, 29, 30, 31)</sup>, en nuestra serie fue incluso superior.

El largo retraso diagnóstico puede explicarse por la escasa expresividad clínica, con mínimos o nulos síntomas infecciosos; algunos pacientes, incluso, nunca llegaron a consultar a su médico hasta el ingreso diagnóstico. Esto se puso especialmente de manifiesto en uno de los pacientes, que llegó a presentar durante varios años febrícula intermitente con buen estado general.

El PA podría ser capaz de producir El de evolución extremadamente lenta, asintomáticas o incluso quedarse de forma quiescente sobre la válvula, sobre todo si ésta es protésica.

En la **tabla 11** se comparan los hallazgos clínicos de nuestra serie con los de los casos de la literatura. No ha sido posible separar los distintos síntomas y signos en “*presentación clínica*” y “*al ingreso diagnóstico*” en los casos de la

## DISCUSIÓN

literatura, por la falta de datos, salvo en el caso de “*disfunción protésica*”. En 12 de los 30 casos de EIVPPA evaluados en su totalidad, correspondientes a una serie <sup>(37)</sup>, no se hace mención a síntomas clínicos, por lo que no se han contabilizado en los porcentajes de aparición de los síntomas.

	SINTOMAS Y SIGNOS EN PRIMER EPISODIO			RECAIDAS	
	SERIE ACTUAL		CASOS LITERATURA		
	PRESENTACIÓN CLINICA	AL INGRESO DIAGNÓSTICO		SERIE ACTUAL	CASOS LITERATURA
Fiebre	26%	46,6%	67%	100%	33%
Escalofríos/Tiritona	0%	0%	16,6%	25%	-
Sudoración	0%	6,6%	16,6%	25%	-
MEG/SD constitucional	13,3%	20%	27%	25%	33%
Síntomas neurológicos	20%	26,6%	38%	50%	-
Disfunción protésica	33,3%	80 %	12 % - 50% (*)	75%	-
Angina	13,3%	13,3%	-	0%	-
ICC	13%	6o%	33%	25%	-
Manifestaciones cutáneas	6,6%	6,6%	16,6%	50%	33%
Manifestaciones reumatológicas	6,6%	6,6%	11%	50%	33%
Nuevo soplo	0%	80%	44%	75%	-
Ruidos protésicos disminuidos	0%	6,6%	-	0%	-
Esplenomegalia/ Embolismo esplénico	0%	6,6%	11%	25%	-
Síntomas no especificados	-	-	66%	-	33%

**TABLA 11: MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS EIVPPA DE LA SERIE ACTUAL Y DE 30 CASOS DE LA LITERATURA**

Síntomas neurológicos: ACVA, AIT, síncope. Manifestaciones cutáneas: nódulos de Osler, hemorragias en astilla, úlceras necróticas. Manifestaciones reumatológicas: artromialgias, artritis, espondilodiscitis.  
 (\*)Porcentajes referidos a la frecuencia de disfunción protésica como presentación clínica inicial y como dato encontrado al ingreso.

La aparición de fiebre fue también menos frecuente que en las series generales de EI protésica <sup>(111,122)</sup>, tanto en este estudio como en los casos publicados, aunque fue menor en el nuestro. Además, ésta se presentó, habitualmente, con curso intermitente y no asociada con tiritona. Sin embargo, en las recaídas la fiebre ocurrió en la totalidad de los casos, apareciendo sólo en un tercio de los casos descritos en la literatura.

La manifestación más frecuente fue la disfunción protésica progresiva, acompañada de insuficiencia cardíaca y la presencia de nuevo soplo, en una frecuencia mayor a lo reseñado <sup>(9, 14-16, 19, 21, 27, 29, 31-33, 35)</sup>. La disfunción protésica progresiva fue inicialmente un hallazgo casual ecocardiográfico en algunos pacientes, pero en el ingreso diagnóstico fue sintomática en el 80%. La disfunción protésica también es un hallazgo frecuente en la literatura y en 2 casos fue el síntoma principal por el que se sospechó la EI <sup>(15, 35)</sup>.

La proporción de síntomas neurológicos publicada es mayor que en esta serie, pero en ambos casos superior a la incidencia general de complicaciones neurológicas de las endocarditis protésicas <sup>(123)</sup>. Fue llamativo lo recurrente de su curso, llegando en algún caso a repetirse a lo largo de años.

Esta tendencia particularmente embolígena de las EI por PA, independientemente del tamaño de las vegetaciones podría explicarse, en parte, por la producción por estos microorganismos de una heparinasa, que impide la formación de un coágulo firmemente adherente al endocardio mural

<sup>(32)</sup> pero también podría ser consecuencia de la suelta de fragmentos de la biocapa al torrente circulatorio <sup>(72)</sup>.

Las manifestaciones cutáneas, reumáticas y la esplenomegalia fueron algo más frecuentes en la literatura.

Los datos clínicos discordantes encontrados entre nuestra serie y la literatura parecen deberse a que nuestra metodología ha permitido identificar las endocarditis con menor sintomatología infecciosa. La sospecha del cirujano cardiaco en el momento del recambio jugó un papel fundamental. Otros autores también han recogido esta apreciación <sup>(29, 33)</sup>.

A la luz de los resultados del presente trabajo posiblemente sería recomendable enviar para estudio microbiológico y anatomopatológico todas las prótesis reemplazadas por disfunción. Es probable que esta medida haga posible el diagnóstico de EIVPPA que no han dado síntomas infecciosos, o de El protésicas por otros microorganismos poco virulentos.

La infección como causa de disfunción de dispositivos protésicos ha sido ya descrita en cirugía ortopédica. El estudio microbiológico de los aflojamientos articulares, ha cuestionado que éstos sean “asépticos” <sup>(124)</sup>. Nelson et al argumentan que la presencia de bacterias, embebidas en una biocapa, en la superficie de las prótesis pueden producir infecciones subclínicas cuya única manifestación clínica sea la disfunción protésica, que cause dolor o datos radiográficos sugerentes de aflojamiento. En estos casos las técnicas rutinarias

de procesamiento microbiológico pueden estar infraestimando la presencia de bacterias cuando la biocapa está presente, y catalogando la muestra como estéril. Tunney y cols <sup>(70)</sup> cultivaron, tras sonicación, 120 prótesis de cadera que habían sido retiradas por disfunción o sospecha de infección. En 26% se aislaron microorganismos, que resultaron ser *Staphylococcus sp* (27%), *PA* (46%) e infección mixta en el 15%. Un 66% de ellas habían sido catalogadas preoperatoriamente de aflojamiento aséptico o luxación. Hay que destacar, además, que el 92% de las prótesis en las que se confirmó la presencia del *PA* habían sido implantadas al menos 2 años antes.

Estos trabajos apoyan que la infección de las prótesis cardíacas puedan manifestarse también como disfunción y con escasas manifestaciones infecciosas.

Otra característica importante fue la presencia de síntomas relacionados con inmunocomplejos circulantes, como mialgias locales, artritis aséptica, tenosinovitis, lesiones necróticas cutáneas, *livedo reticularis*, o insuficiencia renal progresiva. Existen tres publicaciones de endocarditis por *PA* en las que se describen manifestaciones inmunológicas, incluyendo una glomerulonefritis que preciso corticoides a altas dosis para la curación <sup>(22, 30, 38)</sup>

En uno de ellos se detectaron también anticuerpos anticardiolipina, pero en esta ocasión no se produjeron manifestaciones renales, sino un accidente cerebrovascular en presencia de fiebre <sup>(22)</sup>.

Es probable que parte de la fisiopatología de la enfermedad esté relacionada con fenómenos inmunológicos inflamatorios, como ya ha sido descrito en otras infecciones producidas por *PA* como el acné,<sup>(77)</sup> o las endoftalmitis, en las que se necesita siempre asociar corticoides para la curación<sup>(2)</sup>. También el síndrome inflamatorio SAPHO (Sinovitis, Acné, Periostitis, Hiperostosis, Osteítis) se ha relacionado con la infección por *PA*<sup>(45)</sup>, habiéndose cultivado en los tejidos de estos pacientes<sup>(46-48)</sup>. El caso del paciente número 13 podría tratarse de un síndrome SAPHO, ya que reunía varios de sus criterios (sinovitis, acné y osteítis), aunque en él, el diagnóstico de artropatía psoriásica justificaba en parte los hallazgos reumatológicos. Otro dato que hacía pensar en esta posibilidad fue la mejoría y en ocasiones la resolución completa de los síntomas cutáneos y reumatológicos tras los ciclos de antibióticos. En la literatura no existe ningún caso descrito de síndrome SAPHO y endocarditis.

Las recaídas tardías fueron otra característica reseñable en nuestra serie. Existen tres casos descritos en la literatura<sup>(9, 21, 37)</sup>, en uno el paciente tuvo cuatro episodios en cuatro años, los otros dos recayeron a los 5 y 10 meses respectivamente. Según la clasificación vigente la mayoría de los episodios de recaída hubieran sido catalogados como reinfección. Con los datos actuales, parece recomendable un seguimiento estrecho, no inferior a dos años, para descartar recaídas, especialmente en los pacientes en los que no se ha retirado todo el material protésico. El seguimiento de los episodios del presente trabajo fue muy dilatado en el tiempo, y probablemente permitió diagnosticar la mayoría de las recaídas. En la literatura existe seguimiento en 7 pacientes, y sólo en 4 fue prolongado (>1 año)<sup>(7, 16, 23, 24, 26-28)</sup>. En nuestros pacientes las

recaídas tuvieron un cuadro clínico más florido. Sólo en dos de los pacientes descritos se apreció un cuadro más prolijo con síntomas cutáneos y reumatológicos no presentes en el primer episodio <sup>(21)</sup>. Se han comunicado también recaídas tardías (de hasta 7 años) en infecciones sobre shunts ventriculoperitoneales, demostrando la biocapa mediante microscopía óptica de barrido <sup>(78)</sup>.

### **ECOCARDIOGRAFÍA**

La expresión ecocardiográfica, más frecuente, fue la disfunción protésica por dehiscencia periprotésica casi siempre sin abscesos o pseudoaneurismas. También la disfunción protésica (50%) es el dato predominante en las EIVPPA descritas <sup>(9, 14-16, 19, 21, 27, 29, 31, 32, 34, 35))</sup>, aunque la frecuencia de vegetaciones (35%) o abscesos (47%) o abscesos es mayor que en el presente trabajo. Hecho explicable por las diferencias metodológicas. Los abscesos se localizaron siempre en prótesis aórticas. Al contrario que en nuestra serie, no se ha descrito ningún caso en que la manifestación ecocardiográfica sea la estenosis. La desinserción masiva de la válvula <sup>(29)</sup> es otra manifestación ecocardiográfica.

El presente estudio muestra que la exploración ecocardiográfica inicial puede ser normal, y la disfunción desarrollarse lentamente en el tiempo. Por ello, si existen datos clínicos sugerentes como embolismos neurológicos repetidos con rango de anticoagulación adecuado o hemocultivos positivos para *PA* debe

hacerse un seguimiento clínico y ecocardiográfico para descartar la enfermedad.

A través de este trabajo se observa que la EIVPPA en las recaídas suele manifestarse ecocardiograficamente con el mismo tipo de disfunción valvular. Sólo en 2 casos publicados se aportan datos ecocardiográficos de las recaídas, uno de ellos desarrolló dehiscencia protésica <sup>(21)</sup>, al igual que en su primer episodio.

## **MICROBIOLOGÍA**

El presente estudio y los publicados en la literatura <sup>(9, 16, 23, 35, 39)</sup> muestran que los hemocultivos deben incubarse al menos 3 semanas y las muestras quirúrgicas hasta 30 días para no infradiagnosticar la EIVPPA. El cultivo de las muestras quirúrgicas mostró un mayor rendimiento que los hemocultivos.

Hay que resaltar además que, en ocasiones, los cultivos fallan a la hora de demostrar el crecimiento del *PA*, cuando este se ha intuido en la tinción de Gram o en el examen anatomopatológico <sup>(32, 33)</sup>.

Este comportamiento microbiológico podría deberse en parte a la presencia de la biocapa, que condicionaría, por un lado que los hemocultivos fueran positivos sólo tras la suelta de bacterias planctónicas al torrente sanguíneo, y el que las bacterias embebidas dentro de la biocapa crezcan más lentamente por su estado de aparente quiescencia.



## DISCUSIÓN

Por este motivo algunos autores enfatizan la necesidad de utilizar métodos especiales para conseguir el crecimiento del microorganismo, como la trituración del tejido previo a su cultivo <sup>(16)</sup>, metodología que se usó en nuestro centro.

El procesamiento de los cultivos utilizando trituración en mortero de los tejidos, como en nuestro centro, o la sonicación de las prótesis aumenta el rendimiento del cultivo en infecciones protésicas y debe ser recomendado <sup>(16, 87)</sup>. La utilización de cultivo en anaerobiosis, en catéteres intravasculares, aumenta la detección del PA. <sup>(89)</sup> La presencia del PA puede ser infraestimada si no se utilizan estas técnicas de procesamiento y si no se mantienen las muestras en larga incubación hasta 4 semanas.

Dado que los tiempos de incubación de los hemocultivos y de las muestras quirúrgicas suelen ser inferiores, ésta larga incubación debe solicitarse expresamente al microbiólogo.

### **BIOLOGÍA MOLECULAR: DETECCIÓN DE *P. ACNES* MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL**

La nula detección de ADN de PA en las muestras conservadas en parafina, podría explicarse por la escasa cantidad total de ADN extraído. Sin embargo, en las muestras en fresco la PCR fue sensible, aunque no fue positiva en todos los fragmentos analizados. Es algo ya reportado en la literatura, que el rendimiento de las muestras en parafina es muy inferior al obtenido en tejido en fresco para la detección de ADN. Además, la existencia de un inóculo presumiblemente muy bajo en las EIVPPA podría dar falsos negativos en la

PCR. Se ha descrito, en las infecciones protésicas de cadera por *PA*, que puede ser necesario un inóculo  $>10^5$  ufc/ml para que las muestras resulten positivas en la PCR <sup>(70)</sup>.

Por otro lado, es posible que el inóculo bacteriano se distribuya de forma no uniforme tanto en la válvula como en el tejido periprotésico, o que incluso sea menor en ésta última localización que en la prótesis valvular. Esta hipótesis estaría apoyada por los resultados del caso nº 14, donde la positividad de la PCR en las muestras del tejido periprotésico no fue uniforme, y también por las observaciones de Tunney y cols <sup>(70)</sup> que aislaron sólo en el 19% de los tejidos periprotésicos de las prótesis de cadera infectadas el microorganismo previamente identificado en la prótesis, pese a una similar rutina de procesamiento.

Por todo ello, un solo resultado negativo no sería suficiente para descartar la presencia de infección, y deberían analizarse siempre la prótesis y distintos fragmentos del tejido periprotésico para mejorar el diagnóstico microbiológico.

Puede haber también factores técnicos que influyan en la sensibilidad, como es el grado de dilución de las muestras. El hecho de que en uno de los casos de este estudio se necesitó diluir las muestras para alcanzar la positividad hace sospechar la existencia de abundantes inhibidores que dificultaron la unión de la sonda. Es posible, por tanto, que ciertas muestras necesiten una mayor dilución para mejorar la detección del ADN.

En otras publicaciones la positividad de la PCR ayudó al diagnóstico de la EIVPPA <sup>(31, 32, 40)</sup>. En dichos artículos no se especifica si la muestra analizada correspondía a tejido periprotésico o a válvula.

## **TRATAMIENTO Y EVOLUCIÓN**

En nuestro estudio cabe reseñar la alta utilización de los antibióticos betalactámicos y la buena respuesta clínica a su introducción.

El perfil habitual de sensibilidad antibiótica del *PA* muestra, como en el presente estudio, sensibilidad a penicilina, cefalosporinas, eritromicina, y clindamicina, siendo en cambio resistente a metronidazol y aminoglucósidos. Oprica y Nord 2005 investigaron 304 aislamientos de *PA* en infecciones invasivas, en Europa, encontrando un 100% de sensibilidad a penicilina y vancomicina, y un 15% de resistencias a clindamicina <sup>(125)</sup>.

Nuestros pacientes recibieron, generalmente, betalactámicos, con buena respuesta clínica a su introducción. En la literatura se encuentra también una amplia utilización de los betalactámicos, una vez identificado el microorganismo. En 3 casos se empleó clindamicina en monoterapia <sup>(5)</sup>, en terapia combinada junto a penicilina <sup>(31)</sup>, o como tratamiento oral supresor (TOS) tras el tratamiento parenteral <sup>(34)</sup>. En un caso se realizó tratamiento combinado de un betalactámico con rifampicina <sup>(40)</sup>.

La duración del tratamiento antibiótico fue habitualmente la recomendada para las válvulas protésicas, aunque en 3 casos fue menor, sin que se acompañase de recaída. En la literatura 10 casos se trataron  $\leq 6$  semanas, y 16 se trataron 6 semanas.

No hay actualmente un consenso en las guías clínicas sobre cómo tratar las endocarditis por este microorganismo.

La antibioterapia seguida de cirugía de recambio valvular curó a la mayoría de los pacientes. El tratamiento antibiótico aislado sirvió para controlar los síntomas, pero no consiguió casi nunca la erradicación de la infección en los pacientes de este trabajo. También fracasó para prevenir la recaída cuando su instauración fue tardía.

En la literatura, 10 pacientes con EIVPPA recibieron antibioterapia exclusivamente, pero sólo en 2 se detallan los datos clínicos. Uno no recibió TOS y no recidivó pero no se comenta el periodo de seguimiento <sup>(11)</sup>. El otro recibió TOS con Amoxicilina durante 2 semanas, y recayó a los 5 meses <sup>(9)</sup>. Se instauró un nuevo ciclo de TOS durante 5 meses, y no se describe nueva recaída tras 18 meses de seguimiento. Hay un paciente que tras la cirugía recibió TOS durante 6 meses, sin describirse posterior recidiva, aunque el seguimiento no se especifica en el artículo <sup>(34)</sup>. Otro paciente recibió TOS durante 6 meses únicamente cuando sufrió recidiva, sin especificarse en el artículo cual fue el antibiótico empleado <sup>(21)</sup>.

El hecho de que un correcto tratamiento antibiótico no sea suficiente para conseguir la curación sugiere la participación de la biocapa. No obstante, el tratamiento oral supresor podría ser de utilidad en pacientes en los que la

cirugía esté contraindicada o en los que el material protésico no ha sido completamente retirado, aunque su duración no está bien establecida.

La alta tasa de dehiscencia protésica precoz que se encontró es inusual en nuestro centro. La causa de las mismas no pudo ser identificada, ya que los cultivos fueron negativos y la histología fue inespecífica. La sospecha de que todas o al menos parte de ellas hayan sido EIVPPA con muy bajo inóculo no puede ser evitada. Recientemente se ha descrito un caso de dehiscencia protésica aguda como manifestación clínica de EIVPPA <sup>(35)</sup>. Asimismo en la literatura está ampliamente descrito el aflojamiento protésico (en ortopedia) en relación con infecciones subclínicas por *PA* <sup>(71)</sup>.

La mortalidad se encontró dentro del rango descrito en la literatura (13-27%) <sup>(32, 37)</sup>.

### **DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA**

En este trabajo fue fundamental la experiencia y la capacidad observadora del cirujano, gracias a las cuales gran parte de las EIVPPA pudieron ser diagnosticadas. Otros autores refieren también que la sospecha de endocarditis se fundó en a los hallazgos intraoperatorios <sup>(29,33)</sup>.

La apariencia macroscópica de las prótesis cardiacas infectadas por *PA* no ha sido descrita con detalle en la literatura <sup>(29, 33)</sup>. Nuestros datos sugieren que la

presencia de un pannus de aspecto friable y grisáceo, con o sin pseudoendotelización parcial de la prótesis, debería alertar, sobre todo en los casos de disfunción valvular, y hacer descartar la EIVPPA.

El término “pannus” es un concepto macroscópico que hace referencia a un tejido de granulación con vascularización superficial. En ninguna de las publicaciones de EIVPPA en las que se describen los hallazgos macroscópicos, se hace mención a la existencia de este pannus. Tan sólo en un caso reciente se describe la presencia de un tejido friable y suturas desechas, junto a una desinserción del anillo protésico <sup>(35)</sup> sin otros datos sugerentes de endocarditis. Este pannus friable podría estar jugando un papel en los fenómenos embolígenos, ya que por su consistencia podría desprenderse. Asimismo al no ser una estructura pediculada es fácil que no se detecte bien en el ecocardiograma.

La desinserción de la prótesis por dehiscencia o destrucción de las suturas fue frecuente tanto en la presente serie como en las EIVPPA (36%) descritas en la literatura <sup>(12, 21, 29, 35)</sup>. Es posible que la desinserción protésica con mínimos signos inflamatorios sea una de las formas más características de manifestación de las infecciones por *PA* como sucede en las prótesis articulares <sup>(69)</sup>.

La falta de pseudoendotelización completa detectada en una de las válvulas, podría apoyar que la infección se hubiera iniciado en el periodo perioperatorio.

## **HISTOLOGÍA**

Los hallazgos histológicos de las EIVPPA, no descritos previamente en la literatura, mostraron datos compatibles con una infección crónica. Fue particularmente llamativa la presencia de tejido de granulación, también descrito en EI nativas por *PA* <sup>(24)</sup> y en las infecciones de prótesis articulares por *PA* <sup>(70)</sup>; es interesante mencionar que, en los últimos años, se han publicado numerosos trabajos que relacionan la sarcoidosis con la presencia de *PA* <sup>(34)</sup>. Recientemente se ha descrito una reacción sarcoidosis-like en el seno de un síndrome de reconstitución inmune, en el que el patógeno involucrado fue presumiblemente *PA* <sup>(42)</sup>.

Como se comentó anteriormente, el *PA* es capaz de inducir la producción de citoquinas proinflamatorias, entre otras, TNF-  $\alpha$ , factor que se ha sugerido que es la que promueve la formación de los granulomas <sup>(54)</sup>. Por tanto la activación del sistema inmune debida a la infección por el *PA* podría inducir la formación de granulomas.

La ausencia de colonias bacterianas en las muestras de esta serie iría a favor de la presencia de un inóculo mínimo, sólo demostrable por la presencia de biocapa en la superficie de la prótesis. Además, el hecho de no encontrar colonias bacterianas no excluye la infección, ya que en las endocarditis subagudas es habitual el que la mayoría de los microorganismos hayan desaparecido en el momento del examen histológico <sup>(126)</sup>.

Los estudios histológicos realizados también en prótesis ortopédicas retiradas por infección <sup>(70)</sup>, también muestran grados importantes de inflamación con escasa o nula población bacteriana.

La ausencia de signos de actividad aguda, y la presencia de infiltrado inflamatorio crónico es compatible con una endocarditis de curso subagudo o crónico <sup>(125)</sup>, y similar a lo apreciado en la infección protésica ortopédica por *PA* <sup>(70)</sup>, donde no existe siempre infiltración neutrofílica, pero si infiltrados por linfocitos y macrófagos.

Además en las enfermedades causadas por bacterias de crecimiento intracelular, como la fiebre tifoidea y la tuberculosis, es característica una escasa respuesta inflamatoria neutrofílica <sup>(127)</sup>. El *PA* es capaz de crecer intracelularmente <sup>(57)</sup> y por tanto puede producir una respuesta histológica similar.

Existen 2 casos de EI por *PA* sobre válvula nativa con una descripción detallada histológica; en ellas se reseña neovascularización, hialinización y proliferación fibroblástica, con áreas de necrosis fibrinoide en uno <sup>(5)</sup>, y degeneración mixoide, calcificaciones, junto con esclerosis de las válvulas, exudado fibrinoso e infiltrado neutrofílico, tejido de granulación en el otro <sup>(24)</sup>, junto a la presencia de colonias bacterianas. Estos hallazgos son también sugerentes de infección crónica.

La metalosis en el tejido periprotésico, presente en dos casos de la presente serie (con prótesis Carbomédics) se ha relacionado con desinserciones



protésicas en ortopedia por mecanismos inmunológicos <sup>(97)</sup> o en respuesta a infección subyacente <sup>(68)</sup>; estudios experimentales han demostrado, concretamente, que la presencia de metalosis puede inducir la producción de citoquinas que reabsorben hueso <sup>(100)</sup>.

También el ácido propiónico liberado por el *PA* podría producir un efecto destructivo sobre el material protésico, ya que dicho ácido puede ser corrosivo para los metales en presencia de agua y a ciertas temperaturas.

En la literatura no hay descrito ningún caso de metalosis en endocarditis protésicas.

El hecho de que, únicamente se apreciara trombosis y pseudoendotelización en las prótesis Sorin, permite especular que la infección por *PA* podría dañar el carbofilm, lo que ocasionaría una mayor susceptibilidad a la trombogénesis y una reducción en la capacidad de endotelización de las prótesis. No obstante serían necesarios nuevos experimentos para confirmar esta hipótesis.

# **DISCUSIÓN SOBRE LA INVESTIGACIÓN**

## **BÁSICA**

### **1.- DESARROLLO Y DETECCIÓN DE LA BIOCAPA DE P.**

#### **ACNES**

Los experimentos *in vitro* realizados hasta ahora se han realizado en material protésico articular, neuroquirúrgico o en catéteres <sup>(55, 76, 78)</sup>. El presente trabajo es el primero en estudiar la formación de biocapa *in vitro* sobre prótesis valvulares cardíacas. Además es el único en el que se han empleado dos métodos diferentes: la tinción de las bacterias y la tinción de la matriz extracelular.

El presente trabajo muestra la utilidad de la sonicación para separar las bacterias adheridas a las válvulas protésicas cardíacas, al igual que en otros materiales protésicos <sup>(69, 70, 87, 88)</sup>.

El hecho de que se encuentren bacterias en el líquido tras sonicación, cuando las válvulas habían sido lavadas previamente para eliminar las bacterias no adheridas, apoya el que éstas estaban, efectivamente, adheridas. Esta adherencia a las prótesis cardíacas se realizó en un corto periodo de tiempo de tan sólo 3 días. El PA posee estructuras que hacen posible la adhesión, como el tener en su superficie una proteína fijadora de fibronectina <sup>(86)</sup>, pero nunca

## DISCUSIÓN

antes se había demostrado *in vitro* que la superficie de una prótesis cardiaca metálica fuera un buen sustrato al que *PA* se adhiera con facilidad.

Este trabajo encontró una capacidad de adhesión y de formar biocapa del *PA* similar para los 3 tipos de válvulas estudiadas con o sin teflón.

Los espesores encontrados en las muestras examinadas mediante microscopía láser confocal fueron mayores que los descritos por Tunney y cols usando un método similar de detección de la biocapa (3-4.5  $\mu\text{m}$ ) <sup>(70)</sup>. Esta diferencia, probablemente, se deba a que las muestras de Tunney procedían de infecciones de pacientes donde el inóculo debía ser menor que en el presente estudio *in vitro*. Es posible que el experimento *in vitro* realizado no refleje, por completo, las condiciones de la formación de la biocapa por *PA* en el cuerpo humano. Por tanto, se desconoce si la metodología será adecuada para demostrar la biocapa en las muestras quirúrgicas de EIVPPA.

El calcoflúor se utilizó con el propósito de demostrar la matriz extracelular de la biocapa. A pesar de seguir consecutivamente varios protocolos descritos en la literatura <sup>(91, 107-110)</sup>, las muestras mostraron nula o mínima captación.

Puede haber diferentes explicaciones a estos resultados: por un lado el protocolo de tinción con calcoflúor no está bien establecido en la literatura, y así se pueden encontrar, en los distintos trabajos en los que se emplea, muy diferentes concentraciones, tiempos de tinción y condiciones de luz y temperatura según el tipo de microorganismo <sup>(91, 107-110)</sup>. Por otro lado, en ninguno de los trabajos donde se usó calcoflúor se ha analizado la biocapa del

*PA*. Este trabajo es el primero en tratar de teñir con calcoflúor dicha matriz, y es posible que la composición de la biocapa del *PA* sea diferente y no permita la unión para conseguir dicha tinción.

Clásicamente se ha descrito que la biocapa se compone de una matriz exopolimérica compuesta por polisacáridos <sup>(74)</sup>. Pero otras publicaciones mencionan que parte de dicha matriz es proteica <sup>(73)</sup>. Si la matriz de la biocapa del *PA* fuera fundamentalmente proteica, el calcoflúor mostraría mínima o nula captación. Además en algunas infecciones, las biocapas pueden estar compuestas no sólo de bacterias y matriz extracelular, sino también de plaquetas fragmentadas y otras moléculas pertenecientes al hospedador, como la fibrina <sup>(128)</sup>. Para añadir más complicación, es posible que no exista un único fenotipo de biocapa para cada especie, y que ésta muestre una composición u otra, en función del microambiente o de las condiciones en las que se desarrolle, que induciría la expresión de unos genes o de otros <sup>(128)</sup>. Con la reciente publicación del genoma del *PA* <sup>(85)</sup>, como ya se ha comentado previamente, han quedado al descubierto ciertos genes involucrados en la producción de polisacáridos, pero esto no implica que puedan existir otros, codificadores de otras sustancias, como proteínas o lípidos, que puedan estar formando parte mayoritaria de la biocapa.

Hasta la fecha no se ha descrito la composición de la biocapa del *PA* en ninguna publicación. Serán necesarios, nuevos experimentos, quizás con otras tinciones, como lectinas, o con métodos bioquímicos para caracterizar la matriz polimérica de la biocapa del *PA*.

## **2.- DETECCIÓN DE BIOTIPO DEL P. ACNES.**

Este estudio demuestra, por primera vez, que los biotipos I y II del PA pueden causar endocarditis protésica. Como ya se expuso en la introducción (paginas 12-14), el tipo I suele estar en las infecciones cutáneas y bucodentales y el tipo II se ha encontrado hasta en el 70% de las infecciones de prótesis de cadera<sup>(64)</sup>. Sin embargo no existían datos hasta la fecha sobre los biotipos de PA implicados en la endocarditis. El escaso número de cepas estudiadas precluye hacer conclusiones sobre un diferente comportamiento clínico según el biotipo de PA, aunque todos los pacientes con cepas de biotipo II presentaron fenómenos embólicos.

## **3.- DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN VGEF EN SANGRE PERIFÉRICA**

Comparado con la población normal, analizada en nuestro centro por el Dr. Gamallo y cols (Datos no publicados), se aprecia una distribución similar de los polimorfismos de los genes 2578 y 634. En cambio, en lo que respecta al gen 1154, mientras que en población normal el polimorfismo predominante es el G/G (68,7%), en los pacientes estudiados se aprecia una clara dominancia del polimorfismo G/A (66,6%) (ver **tabla 12**)

## DISCUSIÓN

GEN	POLIMORFISMO	POBLACIÓN NORMAL	PACIENTES ESTUDIADOS
2578	<b>A/A (WT)</b>	24,2%	2/7 <b>28,5%</b>
	C/C	20,2%	1/7 <b>14,2%</b>
	C/A	55,6%	4/7 <b>57,1%</b>
1154	<b>G/G (WT)</b>	68,7%	1/6 <b>16%</b>
	A/A	3,03%	1/6 <b>16%</b>
	G/A	28,3%	4/6 <b>66,6%</b>
634	<b>G/G (WT)</b>	27,3	3/8 <b>37,5%</b>
	C/C	32,3%	0/8 <b>0%</b>
	G/C	40,4%	5/8 <b>62,5%</b>

**TABLA 12: COMPARATIVA DE LA PROPORCIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN VEGF ENCONTRADOS EN POBLACIÓN NORMAL CON RESPECTO A LA POBLACIÓN CON EIVPPA**  
(WT: wild type)

El significado de este hallazgo es incierto; probablemente suponga una diferente respuesta angiogénica ante determinados estímulos con respecto a la población general, que podría ser tanto mayor como menor. Dado que la expresión del VEGF esta ligada a la inflamación crónica, a la fibrosis y a la formación de vasos, podría suceder que portar el polimorfismo G/A para el gen 1154 del VEGF estuviera ligado a una mayor angiogénesis y una mayor respuesta inflamatoria en el lecho de la infección. Esto podría, por otro lado, explicar la tendencia a las dehiscencias periprotésicas, sin absceso perianular, que muchos de nuestros pacientes han desarrollado tras el tratamiento correcto combinado antibiótico y quirúrgico.

## DISCUSIÓN

Este hecho tendría además un interés terapéutico. En la actualidad existe un numero creciente de fármacos antiVEGF, aprobados en distintas patologías, entre ellas numerosas neoplasias sólidas como el carcinoma colorrectal y de mama (Bevacizumav), o en la degeneración macular senil (Pegaptanib y Ranibizumab) <sup>(129)</sup>. El uso de alguno de estos antiVEGF en pacientes con EIVPPA podría suponer una disminución de la actividad angiogénica y antiinflamatoria y la disminución del desarrollo de dehiscencias.

# **CONCLUSIONES**

---



## CONCLUSIONES

1. La endocarditis infecciosa sobre válvula protésica por *Propionibacterium acnes* se presenta generalmente con un curso clínico lentamente progresivo, escasos síntomas infecciosos y frecuente disfunción valvular. El aspecto anatomopatológico es compatible con una infección crónica. Es imprescindible la larga incubación de los cultivos para su diagnóstico. La antibioterapia controla la clínica pero no erradica la infección siendo necesaria la sustitución valvular para la curación. La evolución postquirúrgica puede verse complicada por la presencia de dehiscencia protésica.
2. Es necesaria una estrecha colaboración entre el clínico, el microbiólogo, el cirujano y el patólogo para no infradiagnosticar las endocarditis infecciosas sobre válvula protésica por *Propionibacterium acnes*.
3. El *Propionibacterium acnes* tiene *in vitro* la capacidad de adherirse a las prótesis valvulares mecánicas y de formar biocapa en sólo 3 días, sin mostrar mayor tendencia en unos tipos de válvulas que en otras.
4. No se pueden extraer conclusiones del resto de estudios fisiopatológicos planteados debido al escaso número de experimentos realizados.

# **BIBLIOGRAFIA**

---

1. **Brook I.**, Frazier E.H. *Infections causes by Propionibacterium*. Rev Infect Dis 1991; 13: 819-822
2. **Sunaric-Megevand G**, Pournaras CJ. *Current approach to postoperative endophthalmitis*. Br J Ophthalmol 1997; 81: 1006-15.
3. **Mathisen G.E.**, Meyer R.D., George W.L., Citron D.M, Finegold S.M. *Brain abscess and cerebritis*. Rev Infect Dis 1984; 6: 101-106
4. **Yocum RC**, McArthur J, Petty BG, Diehl AM, Moench TR. *Septic arthritis caused by Propionibacterium acnes*. JAMA 1982; 248: 1741
5. **Lewis JF**, Abramson JH. *Endocarditis due to Propionibacterium acnes*. Am J Clin Pathol 1980; 74: 690-6.
6. **Nishioka K**, Ohashi T, Oshige T, Sanada J, Nakamura K, Hashimoto S. *Isolation of Propionibacterium acnes and Enterobacter cloacae from a case of infective endocarditis*. Kansenshogaku Zasshi 1984; 58: 137-43.
7. **Fornaciari G** Castagnetti E, Maccari S, et al. *A case of infectious Propionibacterium acnes endocarditis*. Clin Ter 1985; 115: 389-92.
8. **Hernández JA**, Pigrau C, Planes A, Fernández de Sevilla T. *Propionibacterium acnes endocarditis on a natural valve*. Rev Clin Esp 1988; 182: 340
9. **O'Neill TM**, Hone R, Blake S. *Prosthetic valve endocarditis caused by Propionibacterium acnes*. Br Med J (Clin Res Ed) 1988; 296: 1444.
10. **Demachy MC**, Eme A, Charon P, Lefort JF. *A propos d'un cas d'endocardite a Propionibacterium acnes*. Med Mal Infect 1988; 5: 288-9

11. **Scheel** O, Sundsfjord A, Lunde P, Andersen BM. *Endocarditis after acupuncture and injection- treatment by a natural healer*. JAMA 1992; 267: 56.
  
12. **Lazar** JM, Schulman DS. *Propionibacterium acnes prosthetic valve endocarditis: a case of severe aortic insufficiency*. Clin Cardiol 1992; 15: 299-300.
  
13. **Abramczuk** E, Rawczynska-Englert I, Meszaros J. *Propionibacterium acnes in the etiology of endocarditis*. Pol Tyg Lek 1992; 47:497
  
14. **Horner** SM, Sturridge MF, Swanton RH. *Propionibacterium acnes causing an aortic root abscess*. Br Heart J 1992; 68: 218-20.
  
15. **Lee** PY, Martin MJ, Treasure T. *Propionibacterium acnes causing perivalve abscess*. Br Heart J 1993; 69: 470
  
16. **Gunthard** H, Hany A, Turina M, Wust J. *Propionibacterium acnes as a cause of aggressive aortic valve endocarditis and importance of tissue grinding: case report and review*. J Clin Microbiol 1994; 32: 3043-5.
  
17. **Besbes** A, Pousse H, Radhouane et al. *Endocardite tricuspídiennne à Propionibacterium acnes: a propos d'un cas infantile*. Med Mal Infect 1994; 24: 112-115
  
18. **Huynh** TT, Walling AD, Miller MA, Leung TK, Leclerc Y, Dragtakís L. *Propionibacterium acnes endocarditis*. Can J Cardiol 1995; 11: 785-7.
  
19. **Caballero Gueto** J, Arana R, Calle G, Caballero Gueto FJ, García de Sancho M, Pinero C. *Acute endocarditis of the native aortic valve caused by Propionibacterium acnes*. Rev Esp Cardiol 1997; 50: 906-8

20. **Corne** PH, Gal E, Yeche S, Reynaud D, Dubois A. *Endocardite à Propionibacterium acnes*. Med Mal Infect 1997; 27: 1039-40
  
21. **Durupt** S, Boibieux A, Ballet-Mechain M, et al. *Propionibacterium acnes infectious endocarditis*. Presse Med 1998; 2127: 1839-41.
  
22. **Chua** AG, Ding J, Schoch PE, Cunha BA. *Pacemaker-induced endocarditis due to Propionibacterium acnes*. Clin Infect Dis 1998; 27: 1541-2.
  
23. **Jimenez-Navarro** MF, Gómez-Doblas JJ, Rodríguez Bailon I, de Teresa Galvan E. *Endocarditis of the native aortic valve due to Propionibacterium acnes*. Rev Clin Esp 1999. 199: 331
  
24. **Moreira** AL, Haslett PA, Symmans WF. *Propionibacterium acnes as the cause of endocarditis in a liver transplant recipient*. Clin Infect Dis 2000; 30: 224-6
  
25. **Mohsen** AH, Price A, Ridgway E, West JN, Green S, McKendrick M. *Propionibacterium acnes endocarditis in a native valve complicated by intraventricular abscess: a case report and review*. Scand J Infect Dis 2001; 33: 379-80
  
26. **Vandenbos** F, Roger PM, Mondain-Miton V, et al. *Ventricular patch endocarditis caused by Propionibacterium acnes: advantages of gallium scanning*. J Infect 2001;43: 249-51
  
27. **Chakour** M, Revel F, Godreuil C, Plotton C, Aubry, Koeck JL. *Infectious endocarditis due to Propionibacterium acnes on a mechanical valve and cardiac estimator electrode*. Presse Med 2002; 31:1414

28. **Zedtwitz-Liebenstein K**, Gabriel H, Graninger W. *Pacemaker endocarditis due to Propionibacterium acnes*. Infection 2003; 31: 184-5
  
29. **Vanagt WY**, Daenen WJ, Delhaas T. *Propionibacterium acnes endocarditis on an annuloplasty ring in an adolescent boy*. Heart 2004; 90: e56.
  
30. **Koya D**, Shibuya K, Kikkawa R, and Haneda M. *Successful recovery of infective endocarditis-induced rapidly progressive glomerulonephritis by steroid therapy combined with antibiotics: a case report*. BMC Nephrol 2004; 5: 18
  
31. **Pan SC**, Wang JT, Hsueh PR, Chang SC. *Endocarditis caused by Propionibacterium acnes: an easily ignored pathogen*. J Infect 2005; 51: e229-231
  
32. **Delahaye F**, Fols S, Celard M et al. *Propionibacterium acnes infective endocarditis. Study of 11 cases and review of literature*. Arch Mal Coeur Vaiss 2005; 98: 1212-8.
  
33. **Clayton JJ**, Baig W, Reynolds GW, Sandoe JA. *Endocarditis caused by Propionibacterium species: a report of three cases and a review of clinical features and diagnostic difficulties*. J Med Microbiol 2006; 55: 981-7.
  
34. **Hinestrosa F**, Djurkovic S, Bourbeau PP, Foltzer M. *Propionibacterium acnes as a cause of prosthetic valve aortic root abscess*. J Clin Microbiol 2007; 45: 259-61.

35. **Van Leeuwen WJ**, Kappetein AP, Bogers AJ. *Acute dehiscence of a valve prosthesis 5 years after implantation*. Int J Cardiol 2007; 117: e79-81
  
36. **Harris KM**, Ang E, Lesser JR, Sonnesyn SW. *Cardiac magnetic resonance imaging for detection of an abscess associated with prosthetic valve endocarditis: a case report*. Heart Surg Sorum 2007; 10: e186-187
  
37. **Lalani T**, Person AK, Hedayati SS, Moore L, Murdoch DR, Hoen B et al. *Propionibacterium endocarditis: A case series from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database and Prospective Cohort Study*. Scand J Infect Dis 2007; 9: 1-9
  
38. **Kimmel M**, Kuhlmann U, Alscher DM. *Pacemaker infection with propionibacterium and a nephritic sediment*. Clin Nephrol 2008; 69:127-9
  
39. **Kanjanauthai S**, Kanlue T. *Propionibacterium acnes: A rare cause of late prosthetic valve endocarditis and aortic root abscess*. Int J Cardiol 2008; 130: e66-8
  
40. **Medaghri-Alaoui T**, Angoulvant D, Celard M, André-Fouët X. *Propionibacterium acnes endocarditis on an aortic prosthesis in a patient carrying a pacemaker*. Med Mal Infect. 2008 ; 38: 676-7
  
41. **Ishige I** et al. *Propionibacterium acnes is the most common bacterium commensal in peripheral lung tissue and mediastinal lymph nodes from subjects without sarcoidosis*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 2005; 22: 33-42.

42. **El Karoui K**, Lanternier F, Brunet A, Blanche P, Guillevin L. *Sarcoidosis-like reaction related to Propionibacterium acnes and Immune Resotratio Syndrome in HIV infection*. J Rheumatol 2007; 34: 2495-6.
43. **Kato H**, Fujimoto T, Inoue O, Kondo M, Koya Y, Yamamoto S et al. *Variant strain of Propionibacterium acnes: a clue to the aetiology of Kawasaki disease*. Lancet 1983; 2: 1383-8
44. **Stirling A**, Worthington T, Rafiq M, Lambert PA, Elliott TS. *Association between sciatica and Propionibacterium acnes*. Lancet 2001; 357: 2024-5
45. **Kotilainen P**, Merilahti-Palo R, Lehtonen OP, Manner I, Helander I, Mottonen T et al. *Propionibacterium acnes isolated from sternal osteitis in a patient with SAPHO syndrome*. J Rheumatol. 1996; 23: 1302-4.
46. **Edlund E**, Johnson U, Lidgren E et al. *Palmoplantar pustulosis and sternoclavicular arthroostitis*. Ann Rheum Dis 1988; 47: 809-815
47. **Pillon P**, Pajon A, Juvin R, Gaudin P, Tourne Y, Pasquier V et al. *Tibial hyperostosis and Propionibacterium acnes*. Rev Rhum Mal Osteoartic 1992; 59: 349-351
48. **Wagner AD**, Mai U, Hammer M, Zeidler H. *Long term antibiotic therapy succesful in patients with SAPHO syndrome*. Arthritis Rheum 1997; 40: S62
49. **Olivieri I**, Padula A, Palazzi C. *Pharmacological management of SAPHO syndrome*. Expert Opin Investig Drugs 2006; 15: 1229-33.
50. **Steinhoff JP**, Cilursu A, Falasca GF, Guzman L, Reginato AJ. *A study of musculoskeletal manifestations in 12 patients with SAPHO syndrome*. J Clin Rheumatol 2002; 8: 13-22



51. **Lai JY**, Chen KH, Lin YC, Hsu WM, Lee SM. *Propionibacterium acnes* DNA from an explanted intraocular lens detected by polymerase chain reaction in a case of chronic pseudophakic endophthalmitis. J Cataract Refract Surg 2006; 32: 522-5
  
52. **Allaker RP**, Greenman J, Osborne RH. *The production of inflammatory compounds by Propionibacterium acnes and other skin organisms.* Br J Dermatol 1987; 117: 175-83.
  
53. **Vowels BR**, Yang S, Leyden JJ. *Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of Propionibacterium acnes: implications for chronic inflammatory acne.* Infect Immun 1995; 63: 3158-65
  
54. **Marino MW**, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, et al. *Characterisation of tumour necrosis factor –deficient mice.* Proct Natl Acad Sci USA 1997; 94: 8093-8
  
55. **Coenye T**, Peeters E, Nelis HJ. *Biofilm formation by Propionibacterium acnes is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors.* Res Microbiol. 2007 May; 158: 386-92.
  
56. **Perry AL**, Lambert PA. *Propionibacterium acnes.* Letters in Applied Microbiology 2006; 42: 185–8.
  
57. **Eady E.A.**, Ingham E. *Propionibacterium acnes - friend or foe?* Rev Med Microbiol 1994; 5: 163-73
  
58. **Nakano A**, Yonekama H, Ueha S, Kitabatake M, Ishikawa S, Kawase I et al. *Intravenous administration of MIP-1alpha with intra-tumor injection of P. acnes shows potent anti-tumor effect.* Int Immunopharmacol 2007; 7: 845-57.

59. **Zinguer AC.** *Effects of immunostimulation with Propionibacterium acnes (Eqstim<sup>R</sup>) in mares cytologically positive for endometritis.* J Equine Vet Sci 1996; 16: 100-3.
  
60. **Ingham E.** *The immunology of Propionibacterium acnes and acne.* Curr Opin Infect Dis 1999; 12: 191-7
  
61. **Jappe U,** Boit R, Farrar MD, Ingham E, Sandoe J, Holland KT. *Evidence for diversity within Propionibacterium acnes: a comparison of the T-cell stimulatory activity of isolates from inflammatory acne, endocarditis and the laboratory.* J Eur Acad Dermatol Venereol 2004; 18: 450-4
  
62. **Johnson JL,** Cummins CS. *Cell wall composition and deoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic coryneforms, classical propionibacteria and strains of Arachnia propionica.* J Bacteriol 1972. 177: 1047-66.
  
63. **Higaki S,** Kitagawa T, Kagoura M, Morohashi M, Yamagishi T. *Correlation between Propionibacterium acnes biotypes, lipase activity and rash degree in acne patients.* J Dermatol 2000; 27: 519-22.
  
64. **Mc Dowell A,** Valanne S, Ramage G, Tunney MM, Glenn JV, McLorinan GC et al. *Propionibacterium acnes Types I and II represent phylogenetically distinct groups.* J Clin Microbiol 2005; 43: 326-34
  
65. **Valanne S,** Mc Dowell A, , Ramage G, Tunney MM, Einarsson GG, O'Hagan S, et al. *CAMP factor homologues in Propionibacterium acnes: a new protein family differentially expressed by types I and II.* Microbiology 2005; 151: 1369-79.
  
66. **McDowell A,** Perry AL, Lambert PA, Patrick S. *A new phylogenetic group of Propionibacterium acnes.* J Med Microbiol 2008; 57: 218-24

67. **Felner JM**, Dowell UR. *Anaerobic bacterial endocarditis*. N Engl J Med 1970; 283: 1188-92
  
68. **Shapiro SE**, Spurling DC, Cavaliere R. *Infections following implant arthroplasties of the forefoot*. Clin Podiatr Med Surg. 1996; 13: 767-91
  
69. **Tunney MM**, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR, Anderson N, Davis RI, Hanna D, Ramage G. *Improved detection of infection in hip replacements. A currently underestimated problem*. J Bone Joint Surg Br 1998; 80: 568-72.
  
70. **Tunney MM**, Patrick S, Curran MD, Ramage G, Hanna D, Nixon JR, Gorman SP, Davis RI, Anderson N. *Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene*. J Clin Microbiol 1999; 37: 3281-90
  
71. **Trampuz A**, Zimmerli W. *Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment*. Swiss Med Wkly 2005; 135: 243-51
  
72. **Costerton JW**, Stewart PS, Greenberg EP. *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science 1999; 284: 1318-22
  
73. **Stewart PS**, Costerton JW. *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms*. Lancet 2001; 358:135-8
  
74. **Donlan RM**, Costerton JW. *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 167-93

75. **Hall-Stoodley L**, Costerton JW, Stoodley P. *Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases*. Nat Rev Microbiol 2004; 2: 95-108.
  
76. **Tunney MM**, Dunne N, Einarsson G, McDowell A, Kerr A, Patrick S. *Biofilm formation by bacteria isolated from retrieved failed prosthetic hip implants in an in vitro model of hip arthroplasty antibiotic prophylaxis*. J Orthop Res 2007; 25: 2-10
  
77. **Burkhart CN**, Burkhardt CG. *Microbiology's principle of biofilms as a major factor in the pathogenesis of acne vulgaris*. Int J Dermatol 2003; 42: 925-27
  
78. **Bayston R**, Ashraf W, Barker-Davies R, Tucker E, Clement R, Clayton J, et al. *Biofilm formation by Propionibacterium acnes on biomaterials in vitro and in vivo: Impact on diagnosis and treatment*. J Biomed Mater Res A 2007; 81: 705-9.
  
79. **Passerini L**, Phang PT, Jackson FL, Lam K, Costerton JW, King EG. *Biofilms on right heart flow-directed catheters*. Chest 1987; 92: 440-6
  
80. **Alexeyev OA**, Marklund I, Shannon B, Golovleva I, Olsson J, Andersson C, Eriksson I, Cohen R, Elgh F. *Direct visualization of Propionibacterium acnes in prostate tissue by multicolor fluorescent in situ hybridization assay*. J Clin Microbiol 2007; 45: 3721-8.
  
81. **Ramage G**, Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR. *Formation of Propionibacterium acnes biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials*. Biomaterials 2003; 24: 3221–27.

82. **Takemura N**, Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Noguchi N, Ebisu S. *Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points*. Eur J Oral Sci 2004; 112: 523-9.
  
83. **Bruggemann H**, Henne A, Hoster F, Liesegang H, Wiezer A, Strittmatter A et al. *The complete genome sequence of Propionibacterium acnes, a commensal of human skin*. Science 2004; 305: 671-3.
  
84. **Burkhart CN**, Burkhardt CG. *Genome sequence of Propionibacterium acnes reveals immunogenic and surface-associated genes confirming existence of the acne biofilm*. Int J Dermatol 2006; 45: 872.
  
85. **Bruggemann H**. *Insights in the pathogenic potential of Propionibacterium acnes from its complete genome*. Semin Cutan Med Surg 2005; 24: 67-72.
  
86. **Yu JL**, Månsson R, Flock JI, Ljungh A. *Fibronectin binding by Propionibacterium acnes*. FEMS Immunol Med Microbiol 1997;19: 247-53
  
87. **Esteban J**, Gomez-Barrena E, Cordero J, Martín-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Fernandez-Roblas R. *Evaluation of quantitative cultures from sonicated retrieved orthopaedic implants in the diagnosis of orthopaedic infection*. J Clin Microbiol 2008; 46: 488-92
  
88. **Trampuz A**, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, Mandrekar JN, Cockerill FR, Steckelberg JM, Greenleaf JF, Patel R. *Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection*. N Engl J Med 2007; 357: 654-63
  
89. **Martín-Rabadán P**, Gijón P, Alcalá L, Rodríguez-Créixems M, Alvarado N, Bouza E. *Propionibacterium acnes is a common colonizer of intravascular catheters*. J Infect. 2008; 56: 257-60

90. **Thurnheer T**, Gmur R, Guggenheim B. *Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm*. J Microbiol Methods 2004; 56: 37-47
  
91. **Stewart PS**, Murga R, Srinivasan R, de Beer D. *Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods*. Wat res 1995; 29: 2006-9
  
92. **Maurin M**, Raoult D. *Bartonella (Rochalimaea) quintana infections*. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 273-92
  
93. **Hakuno D**, Fukuda K. *Role of anti-angiogenic factor chondromodulin-I for maintaining cardiac valvular function*. Clin Calcium 2007; 17:361-72.
  
94. **Garnacho J**, Garnacho MC, Ortiz C, Aldabó T. *Polimorfismos genéticos en la sepsis*. Med Intensiva 2005; 29: 185-91
  
95. **Good P**, Gross K. *Electrophysiology and metallosis: support for an oxidative (free radical) mechanism in the human eye*. Ophthalmologica 1988;196: 204-9
  
96. **Tezer M**, Kuzgun U, Hamzaoglu A, Ozturk C, Kabukcuoglu F, Sirvanci M. *Intraspinal metalloma resulting in late paraparesis*. Arch Orthop Trauma Surg 2005; 125: 417-21.
  
97. **Salvati EA**, Betts F, Doty SB. *Particulate metallic debris in cemented total hip arthroplasty*. Clin Orthop Relat Res 1993; 293: 160-73.
  
98. **Korovessis P**, Petsinis G, Repanti M. *Zweymueller with metal-on-metal articulation: clinical, radiological and histological analysis of short-term results*. Arch Orthop Trauma Surg 2003; 123: 5-11.

99. **Korovessis P**, Petsinis G, Repanti M, Repantis T. *Metallosis after contemporary metal-on-metal total hip arthroplasty. Five to nine-year follow-up.* J Bone Joint Surg Am 2006; 88: 1183-91
  
100. **Rolf O**, Baumann B, Sterner T, Schutze N, Jakob F, Eulert J, Rader CP. *Characterization of mode II-wear particles and cytokine response in a human macrophage-like cell culture.* Biomed Tech (Berl). 2005; 50: 25-9
  
101. <http://ingenieria.udea.edu.co/grupos/revista/revistas/nro029/articulos.html>
  
102. **Mc Dowell A**, Patrick S. *Evaluation of nonculture methods for the detection of prosthetic hip biofilms.* Clin Ortop Rel Res 2005; 437: 74-82
  
103. **Brouqui P**, Raoult D. *New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis.* FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 47: 1-13.
  
104. **Goldenberger D**, Künzli A, Vogt P, Zbinden R and Altwegg M. *Molecular diagnosis of endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing.* J Clin Microbiol 1997; 35: 2733-9
  
105. **Millar B**, Moore J, Mallon P, Xu J, Crowe M, McClurg R, et al. *Molecular diagnosis of infective endocarditis--a new Duke's criterion.* Scand J Infect Dis 2001; 33: 673-80.
  
106. **Liang Z**, La Scola B, Raoult D. *Monoclonal antibodies to immunodominant epitope of Tropheryma whipplei.* Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9:156-9

107. **Uhlich GA**, Cooke Ph, Solomon EB. *Analyses of the red-dry-rough phenotype of an Escherichia coli O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents*. Appl Environ Microbiol 2006; 72: 2564-72.
  
108. **Lehner A**, Iredel K, Eberl L, Breeuwer P, Diep B, Stephan R. *Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various Enterobacter sakazakii strains: aspects promoting environmental persistence*. J Food Prot 2005; 68: 2287-94.
  
109. **Kuhn DM**, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. *Comparision of biofilms formed by Candida albicans and Candida parapsilosis on bioprosthetic surfaces*. Infect Immun 2002; 70: 878-8
  
110. **Jayaraman A**, Sun AK, Wood TK. *Characterization of axenic Pseudomonas fragi and Escherichia coli biofilms that inhibit corrosion of SAE 1018 steel*. J Appl Microbiol 1998; 84: 485-92
  
111. **San Román JA**. *Endocarditis protésica*. En: Vilacosta I, Sarriá C, San Román JA. Endocarditis infecciosa. Ed. Prous Science. 2002.
  
112. **Fernández-Guerrero ML**. *Epidemiología y microbiología de la endocarditis infecciosa*. En: Vilacosta I, Sarriá C, San Román JA. Endocarditis infecciosa. Ed. Prous Science. 2002
  
113. **Vilacosta I**, Sarriá C, San Román J.A. *Endocarditis en ancianos*. En: Vilacosta I, Sarriá C, San Román JA. Endocarditis infecciosa. Ed. Prous Science. 2002
  
114. **Ingham E**, Gowland G, Ward RM, Holland KT, Cunliffe WJ. *Antibodies to P. acnes and P. acnes exocellular enzymes in the normal*



- population at various ages and in patients with acne vulgaris.* Br J Dermatol 1987; 116: 805-12.
115.      **Basal E**, Jain A, Kaushal GP. *Antibody response to crude cell lysate of propionibacterium acnes and induction of pro-inflammatory cytokines in patients with acne and normal healthy subjects.* J Microbiol 2004; 42: 117-25.
116.      **Shannon BA**, Cohen RJ, Garrett KL. *The antibody response to Propionibacterium acnes is an independent predictor of serum prostate-specific antigen levels in biopsy-negative men.* BJU Int 2008; 101: 429-35.
117.      **Zeller V**, Ghorbani A, Strady C, Leonard P, Mamoudy P, Desplaces N. *Propionibacterium acnes: an agent of prosthetic joint infection and colonization.* J Infect 2007; 55: 119-24.
118.      **Wilson APR**, Felmingham D, Gruneberg RN, Treasure T, Sturridge MF. *Contamination of blood during cardiopulmonary bypass: the effect of antibiotic prophylaxis.* J Hosp Infect 1988; 12:35-42
119.      **Leavy BR**. Apparent adverse outcome of acupuncture. J Am Board Fam Pract 2002; 15: 246-48
120.      **Jefferys DB**, Smith S, Brennand-Roper DA, Curry PV. *Acupuncture needles as a cause of bacterial endocarditis.* BMJ 1983; 287: 326-7
121.      **Stellon A**. Acupuncture in patients with valvular heart disease and posthetic valves. Acupunct Med 2003; 21: 87-91

122. **Douglas JL**, Cobbs CG. Prosthetic valve endocarditis. En: Kaye D. (Ed.). *Infective endocarditis*. Raven Press, Nueva York 1992; 375-96
  
123. **Corral I**, Martín-Dávila P, Fortún J, Navas E, Centella T, Moya JL et al. *Trends in neurological complications of endocarditis*. J Neurol 2007 2007; 254: 1253-9
  
124. **Nelson CL**, McLaren AC, McLaren SG, Johnson JW, Smeltzer MS. *Is aseptic loosening truly aseptic?* Clin Orthop Relat Res 2005; 437: 25-30.
  
125. **Oprica C**, Nord CE. *European surveillance study on the antibiotic susceptibility of Propionibacterium acnes*. Clin Microbiol Infect 2005 (11): 204-13
  
126. **Vilacosta I**. *Anatomía patológica*. En: Vilacosta I, Sarriá C, San Román JA. *Endocarditis infecciosa*. Ed. Prous Science. 2002.
  
127. **Robbins SL**, Cotran RS, Kumar V. *Pathologic basis of disease*. 1997. 5th Ed. The W.B. Sanders Company, Philadelphia, Pa.
  
128. **Costerton W**, Veeh R, Schirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. *The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infection*. J Clin Invest 2003; 112: 1466-77
  
129. **Crawford Y**, Ferrara N. *VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies*. Cell Tissue Res 2009; 335: 261-9